

N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of N-(Carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in Bacteria

要約

N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では、S9 mix 非共存下の TA100, TA1535 は 78.1 ~ 2.44 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 156 ~ 2.44 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 39.1 ~ 0.610 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量を, S9 mix 共存下の TA100, TA1535 は 313 ~ 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 2500 ~ 39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 625 ~ 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7用量をそれぞれ設定した。

2回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から, N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

方法

1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および日本バイオアッセイ研究センターより 1997 年 9 月 18 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101²⁾ の 5 菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学)を加え, 0.2 mL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後, 超低温槽で -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, 特性を備えていることを確認した。

2. テスト菌株の前培養

L 字型試験管に 2.5 % ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Oxoid 社)溶液を 10 mL 分注し, これに凍結保存した菌懸濁液を解冻して 20 μL を接種した。37°C で 8 時間振盪培養した後, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 生菌数が $1 \times 10^9/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

3. 被験物質

N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウム(ロット番号:3047, 花王(東京)提供)は, 純度 27.1 % の微黄色透明液体である。被験物質は使用時まで室温, 遮光に密閉容器で保存した。実験終了後, 残余被験物質を分析した結果, 安定性に問題はなかった。

4. 被験物質溶液の調製

注射用水(DW: 大塚製薬工場)を用いて最高用量の溶液を調製した後, 同溶媒で所定用量に段階希釈し, 速やかに試験に使用した。被験物質の秤量に際しては純度換算(27.1 %)を実施した。

5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は, あらかじめ所定の濃度に調製し, -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)
アクリルアミド (和光純薬工業)
NaN₃ : アジ化ナトリウム (和光純薬工業)
9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩
(Sigma-Aldrich Fine Chemicals)
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業)

NaN₃ は DW に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

6. 培地および S9 mix の組成

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mmol/L D-ピオチン, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-agar, Difco 社)0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45°C に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業)を購入し, 使用した。なお, 培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

| | |
|--------------|-------|
| 硫酸マグネシウム・七水塩 | 0.2 g |
| クエン酸・一水塩 | 2 g |
| リン酸二カリウム・無水塩 | 10 g |

| | |
|-----------------|--------|
| リン酸一アンモニウム | 1.92 g |
| 水酸化ナトリウム | 0.66 g |
| グルコース | 20 g |
| 寒天(伊那寒天BA-30 A) | 15 g |

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

| | |
|----------------------|---------------|
| S9* | 0.1 mL |
| 塩化マグネシウム | 8 μ mol |
| 塩化カリウム | 33 μ mol |
| D-グルコース6-リン酸 | 5 μ mol |
| β -NADPH | 4 μ mol |
| β -NADH | 4 μ mol |
| ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) | 100 μ mol |
| 滅菌精製水 | 残量 |

*: 購入したS9(キッコマン)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

7. 試験方法

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37°Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果及び考察

1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101を用いて5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535, WP2 *uvrA*/pKM101の78.1 μ g/plate以上、TA98, TA1537の19.5 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の313 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の1250 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。なお、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。従って本試験では、S9 mix非共存下のTA100, TA1535は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 μ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*/pKM101は156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 μ g/plateの7用量、TA98, TA1537は39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610 μ g/plateの7用量を、共存下のTA100, TA1535は313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 μ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*/pKM101は2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μ g/plateの7用量、TA98, TA1537は625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 μ g/plateの7用量をそれぞれ設定した。

2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535の39.1 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の78.1 μ g/plate以上、TA98, TA1537の19.5 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535の313 μ g/plate、WP2 *uvrA*/pKM101の1250 μ g/plate以上、TA98, TA1537の313 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。なお、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムは当試験施設で並行して実施したほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では陰性の結果が報告されている³⁾。また、類似化合物であるL-Arginine L-gultamate⁴⁾は、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, **113**: 173-215(1983).
- 2) Green MHL, Muriel WJ: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, **38**: 3-32(1976).
- 3) 成見香瑞範ら: *N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカニミニウムのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, **13**:109-112(2006).
- 4) 石館基(監修): 「微生物を用いる変異原性試験データ集」エル・アイ・シー, 東京(1991)p. 41.

連絡先

試験責任者: 榎本佳明
試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 網代真希子
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県神栖市砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)
Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,
Makiko Ajiro
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory
14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255
Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Mutagenicity of N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in bacteria (I)

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose (μg/plate) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean ± S.D.) | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | | Base-pair change type | | | Frameshift type | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> /pkM101 | TA98 | TA1537 |
| S9 mix (-) | 0 ^{a)} | 123 99 (± 112) 113 (± 12) | 13 9 (± 11) 10 (± 2) | 84 95 (± 89) 87 (± 6) | 19 18 (± 20) 23 (± 3) | 10 8 (± 9) 10 (± 1) |
| | 0.610 | NT ^{b)} | NT | NT | 18 21 (± 19) 19 (± 2) | 11 11 (± 11) 12 (± 1) |
| | 1.22 | NT | NT | NT | 17 17 (± 18) 20 (± 2) | 11 8 (± 10) 10 (± 2) |
| | 2.44 | 135 114 (± 117) 101 (± 17) | 11 14 (± 13) 14 (± 2) | 91 94 (± 89) 82 (± 6) | 17 18 (± 17) 17 (± 1) | 9 11 (± 11) 13 (± 2) |
| | 4.88 | 100 99 (± 101) 104 (± 3) | 10 10 (± 10) 11 (± 1) | 72 71 (± 79) 95 (± 14) | 18 18 (± 18) 18 (± 0) | 13 10 (± 12) 12 (± 2) |
| | 9.77 | 98 117 (± 110) 114 (± 10) | 10 11 (± 10) 9 (± 1) | 97 86 (± 91) 90 (± 6) | 17 22 (± 18) 16 (± 3) | 9 10 (± 10) 10 (± 1) |
| | 19.5 | 101 99 (± 103) 108 (± 5) | 13 10 (± 10) 8 (± 3) | 83 75 (± 78) 75 (± 5) | 14* 14* (± 14) 13* (± 1) | 9* 12* (± 10) 8* (± 2) |
| | 39.1 | 85* 69* (± 75) 70* (± 9) | 6* 7* (± 9) 14* (± 4) | 71 92 (± 84) 88 (± 11) | 9* 8* (± 9) 11* (± 2) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) |
| | 78.1 | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) | 61* 68* (± 68) 76* (± 8) | NT | NT |
| | 156 | NT | NT | 71* 58* (± 68) 75* (± 9) | NT | NT |
| S9 mix (+) | 0 | 126 108 (± 115) 111 (± 10) | 15 13 (± 14) 13 (± 1) | 104 94 (± 97) 93 (± 6) | 21 21 (± 23) 26 (± 3) | 23 16 (± 18) 16 (± 4) |
| | 9.77 | 118 119 (± 119) 120 (± 1) | 9 11 (± 11) 14 (± 3) | NT | 24 22 (± 24) 26 (± 2) | 17 24 (± 19) 17 (± 4) |
| | 19.5 | 100 104 (± 105) 111 (± 6) | 11 14 (± 12) 11 (± 2) | NT | 24 22 (± 23) 24 (± 1) | 24 18 (± 20) 19 (± 3) |
| | 39.1 | 121 129 (± 120) 111 (± 9) | 10 14 (± 13) 14 (± 2) | 101 101 (± 102) 104 (± 2) | 23 24 (± 22) 20 (± 2) | 17 19 (± 18) 19 (± 1) |
| | 78.1 | 119 105 (± 115) 121 (± 9) | 10 16 (± 12) 11 (± 3) | 98 99 (± 100) 102 (± 2) | 21 25 (± 23) 23 (± 2) | 18 24 (± 20) 17 (± 4) |
| | 156 | 116 121 (± 113) 101 (± 10) | 10 14 (± 13) 14 (± 2) | 104 92 (± 99) 102 (± 6) | 25 26 (± 26) 26 (± 1) | 22 16 (± 19) 19 (± 3) |
| | 313 | 63* 68* (± 61) 51* (± 9) | 7* 6* (± 7) 9* (± 2) | 100 101 (± 98) 92 (± 5) | 21* 23* (± 21) 20* (± 2) | 11* 15* (± 13) 13* (± 2) |
| | 625 | NT | NT | 96 105 (± 98) 94 (± 6) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) |
| | 1250 | NT | NT | 81* 86* (± 79) 70* (± 8) | NT | NT |
| | 2500 | NT | NT | 50* 40* (± 48) 55* (± 8) | NT | NT |
| Positive control S9 mix (-) | Name | AF-2 ^{c)} | NaN ₃ ^{d)} | AF-2 | AF-2 | 9-AA ^{e)} |
| | Dosage (μg/plate) | 0.01 | 0.5 | 0.005 | 0.1 | 80 |
| Positive control S9 mix (+) | Name | 2-AA ^{f)} | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| | Dosage (μg/plate) | 1 | 2 | 2 | 0.5 | 2 |
| | Number of colonies / plate | 601 587 (± 596) 599 (± 8) | 481 460 (± 471) 472 (± 11) | 1167 1039 (± 1021) 858 (± 155) | 665 700 (± 685) 689 (± 18) | 139 171 (± 143) 120 (± 26) |
| | Number of colonies / plate | 1286 1147 (± 1192) 1143 (± 81) | 207 211 (± 220) 241 (± 19) | 944 941 (± 949) 961 (± 11) | 344 359 (± 366) 395 (± 26) | 216 209 (± 209) 202 (± 7) |

a) Water for injection, b) NT: Not tested, c) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, d) NaN₃: Sodium azide

e) 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride, f) 2-AA: 2-Aminoanthracene

*: Microbial toxicity was observed.

Table 2 Mutagenicity of *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in bacteria (II)

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.) | | | | |
|--------------------------------|--|--|------------------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| | | Base-pair change type | | | Frameshift type | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> /pkM101 | TA98 | TA1537 |
| S9 mix (-) | 0 ^{a)} | 109 111 (± 106) 98 (± 7) | 10 7 (± 9) 10 (± 2) | 66 70 (± 67) 64 (± 3) | 18 18 (± 17) 16 (± 1) | 8 12 (± 9) 7 (± 3) |
| | 0.610 | NT ^{b)} | NT | NT | 16 18 (± 17) 17 (± 1) | 11 10 (± 10) 9 (± 1) |
| | 1.22 | NT | NT | NT | 18 17 (± 18) 18 (± 1) | 11 10 (± 10) 9 (± 1) |
| | 2.44 | 104 107 (± 104) 100 (± 4) | 9 14 (± 11) 9 (± 3) | 65 63 (± 64) 63 (± 1) | 17 18 (± 17) 17 (± 1) | 10 11 (± 11) 11 (± 1) |
| | 4.88 | 117 101 (± 111) 114 (± 9) | 9 9 (± 9) 8 (± 1) | 73 65 (± 72) 77 (± 6) | 21 19 (± 20) 20 (± 1) | 8 11 (± 10) 11 (± 2) |
| | 9.77 | 105 118 (± 109) 103 (± 8) | 10 14 (± 13) 14 (± 2) | 66 68 (± 66) 64 (± 2) | 20 17 (± 18) 16 (± 2) | 10 8 (± 9) 9 (± 1) |
| | 19.5 | 105 110 (± 107) 105 (± 3) | 10 8 (± 9) 8 (± 1) | 63 76 (± 68) 65 (± 7) | 14* 13* (± 13) 11* (± 2) | 7* 9* (± 8) 8* (± 1) |
| | 39.1 | 73* 78* (± 77) 79* (± 3) | 7* 7* (± 7) 6* (± 1) | 74 71 (± 70) 64 (± 5) | 10* 7* (± 9) 11* (± 2) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) |
| | 78.1 | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) | 48* 58* (± 52) 50* (± 5) | NT | NT |
| | 156 | NT | NT | 49* 52* (± 49) 45* (± 4) | NT | NT |
| S9 mix (+) | 0 | 121 122 (± 118) 110 (± 7) | 13 10 (± 11) 9 (± 2) | 77 99 (± 88) 88 (± 11) | 24 20 (± 21) 20 (± 2) | 18 16 (± 16) 14 (± 2) |
| | 9.77 | 138 119 (± 131) 137 (± 11) | 10 9 (± 9) 9 (± 1) | NT | 26 20 (± 22) 21 (± 3) | 16 15 (± 17) 19 (± 2) |
| | 19.5 | 106 101 (± 104) 104 (± 3) | 14 11 (± 14) 16 (± 3) | NT | 24 23 (± 22) 20 (± 2) | 15 14 (± 14) 14 (± 1) |
| | 39.1 | 126 108 (± 123) 135 (± 14) | 13 9 (± 11) 12 (± 2) | 87 90 (± 83) 73 (± 9) | 24 19 (± 22) 24 (± 3) | 17 13 (± 15) 15 (± 2) |
| | 78.1 | 130 124 (± 126) 123 (± 4) | 11 10 (± 10) 10 (± 1) | 94 92 (± 90) 85 (± 5) | 23 27 (± 25) 25 (± 2) | 15 14 (± 14) 13 (± 1) |
| | 156 | 105 110 (± 108) 108 (± 3) | 15 11 (± 12) 10 (± 3) | 87 97 (± 89) 84 (± 7) | 25 23 (± 23) 20 (± 3) | 14 13 (± 14) 16 (± 2) |
| | 313 | 75* 66* (± 72) 74* (± 5) | 6* 8* (± 6) 5* (± 2) | 81 91 (± 82) 74 (± 9) | 17* 15* (± 17) 19* (± 2) | 8* 11* (± 10) 10* (± 2) |
| | 625 | NT | NT | 95 86 (± 86) 77 (± 9) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) | 0* 0* (± 0) 0* (± 0) |
| | 1250 | NT | NT | 67* 66* (± 66) 66* (± 1) | NT | NT |
| | 2500 | NT | NT | 41* 43* (± 40) 36* (± 4) | NT | NT |
| Positive control S9 mix (-) | Name | AF-2 ^{c)} | NaN ₃ ^{d)} | AF-2 | AF-2 | 9-AA ^{e)} |
| | Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | 0.5 | 0.005 | 0.1 | 80 |
| | Number of colonies / plate | 590 695 (± 666) 712 (± 66) | 422 465 (± 430) 403 (± 32) | 1059 1230 (± 1209) 1338 (± 141) | 588 639 (± 626) 650 (± 33) | 149 141 (± 150) 160 (± 10) |
| Positive control S9 mix (+) | Name | 2-AA ^{f)} | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| | Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | 2 | 2 | 0.5 | 2 |
| | Number of colonies / plate | 1042 1199 (± 1175) 1284 (± 123) | 199 200 (± 207) 222 (± 13) | 1065 1026 (± 1036) 1016 (± 26) | 430 393 (± 407) 397 (± 20) | 211 187 (± 201) 204 (± 12) |

a) Water for injection, b) NT: Not tested, c) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-Furyl)acrylamide, d) NaN₃: Sodium azide
 e) 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride, f) 2-AA: 2-Aminoanthracene
 *: Microbial toxicity was observed.

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of *N*-(Carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を調べるため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix非存在下では200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、連続処理法の24時間処理では150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を各々最高濃度として、公差25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で5濃度ずつを設定した。また、連続処理法の24時間処理では、50%以上の細胞増殖抑制を示す用量の標本において分析ができなかったため、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で6濃度を設定し、追加試験を実施した。

短時間処理法のS9 mix存在下およびS9 mix非存在下ならびに連続処理法24時間処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

大日本製薬から入手(2003年9月、入手時:継代14代、凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代4週間以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(Invitrogen Corp., ロット番号: 353445)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5%CO₂)内で3日間前培養した。

前培養後、短時間処理法では、S9 mix存在下および非存在下で被験物質を6時間処理し、その後、新鮮な培養液でさらに18時間培養した。連続処理法では、被験物質を24時間連続処理した。

4. 被験物質

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウム(ロット番号: 3047, 花王(東京)提供)は、純度27.1%の微黄色透明液体である。被験物質は使用時まで室温、遮光下で密閉容器に保存した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。被験物質の秤量に際しては、純度換算(27.1%)を実施した。溶媒は生理食塩液(大塚製薬工場, ロット番号: K3K96)を用いた。被験物質を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下では、同じく50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で7濃度を、連続処理法の24時間処理では12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で6濃度を各々設定した。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性(溶媒)対照群に対する相対増殖率をもって指標とした。この細胞増殖率が50%を挟む2用量を結ぶ直線式より50%の細胞増殖抑制を示す濃度を算出した。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法のS9 mix存在下で242 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix非存在下で146 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の24時間処理で107 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix非存在下では200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、連続処理法の24時間処理では150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を各々最高濃度として、公差25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で5濃度ずつを設定した。また、連続処理法の24時間処理では、50%以上の細胞増殖抑制を示す用量の標本において分析ができなかったため、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で6濃度を設定し、追加試験を実施した。

陽性対照群として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業, ロット番号: GG01)を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で、S9 mix非存在下では、マイ

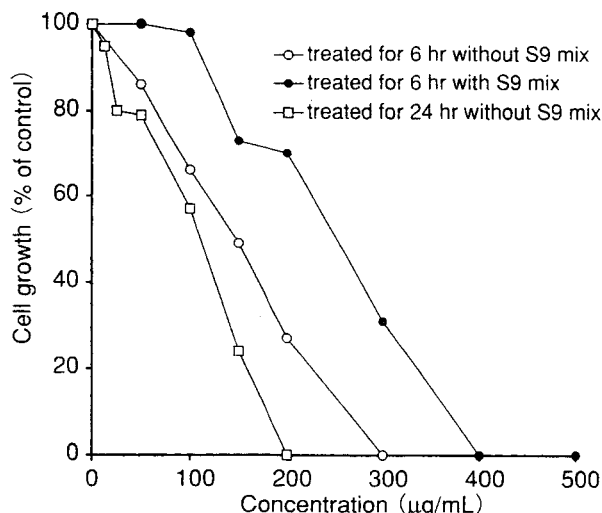


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt

トマイシンC(協和発酵工業, ロット番号: 413ACF)を0.1 µg/mL濃度で, 連続処理法では, マイトマイシンCを0.05 µg/mL濃度で各々設定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に, コルセミドを最終濃度が0.1 µg/mLになるように各ディッシュの培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を, 3 vol%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち, 1つのディッシュから得られたスライドを処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は, 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)¹⁾による分類法に基づいて行い, 染色体型あるいは染色分体型の切断, 交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また, 構造異常および倍数性細胞について1群200個の分裂中期細胞を分析した。ただし, 連続処理法24時間処理の追加試験の120 µg/mLでは, 1群178個(各ディッシュ84個および94個)の分裂中期像しか得られなかった。また, 短時間処理法S9 mix存在下の300 µg/mLの一方のディッシュでは細胞毒性により観察に必要な規定数の分裂中期細胞が得られず, このスライド標本を分析の対象から除外したため, 1群100個の分裂中期細胞のみ分析した。連続処理法24時間処理の本試験の150 µg/mLおよび追加試験の130, 140, 150 µg/mLの両ディッシュから作製した標本についても同様に分析の対象から除外した。

10. 記録と判定

陰性対照群, 陽性対照群および被験物質処理群につい

での分析結果は, 観察した細胞数, 構造異常の種類と数, 倍数性細胞の数について集計し, 各群の値を記録用紙に記入した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は, 石館ら²⁾の判定基準に従い, 染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性, 5%以上10%未満を疑陽性, 10%以上を陽性とした。

11. 細胞増殖の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖を測定した。標本作製時に剥離した細胞の一部を採取し, 血球計算盤で細胞を計数した。

結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した, いずれの被験物質処理群においても, 染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2(本試験)およびTable 3(追加試験)に示した。*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムを加えて24時間連続処理した, いずれの被験物質処理群においても, 染色体構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果から, *N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムは本試験条件下において, 染色体異常を誘発しないと結論した。

なお, 類似化合物であるL-Arginine L-gultamate, Glycine, Isoamyl formate, L-Isoleucine, Methyl AcetylricinolateおよびMonosodium L-aspartateは, 染色体異常試験で陰性の結果が報告されている²⁾。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(編): 「化学物質による染色体異常アトラス」朝倉書店, 東京(1988)pp. 16-37.
- 2) 祖父尼俊雄(監修): 「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(2000)p.62. p.261. p.289. p.294. p.322. p.343

連絡先

試験責任者：成見香瑞範
 試験担当者：堀 一成，齋藤 準，石毛裕子，
 梶原昭彦，高嶋恵美，清成亜紀子，
 高橋美記子，長友弘子
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-0255 茨城県神栖市砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Kazunori Narumi (Study director)
 Kazushige Hori, Hitoshi Saitou,
 Yuko Ishige, Akihiko Kajiwara,
 Emi Takashima, Akiko Kiyonari,
 Mikiko Takahashi, Hiroko Nagatomo
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255
 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt for 6 hr with and without S9 mix

| Group | Concentration (µg/mL) | S9 mix | Time of exposure (hr) | Cell growth index (%) | Number of cells analyzed | Number of structural aberrations | | | | | | Number of cells with aberrations (%) | Number of gaps | polyploid ^{b)} (%) | Judgement ^{c)} | |
|-----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|---|-------------------|--------------------------------|-------------------------|----|
| | | | | | | ctb | cte | csb | cse | frg | total | | | | SA | NA |
| Vehicle ^{a)} | 0 | - | 6-18 | 100 | 200 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2(1.0) | 0 | 0.0 | - | - |
| Test Substance | 100 | - | 6-18 | 79 | 200 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2(1.0) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 125 | - | 6-18 | 77 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1(0.5) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 150 | - | 6-18 | 57 | 200 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 5 | 5(2.5) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 175 | - | 6-18 | 46 | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1(0.5) | 1 | 0.0 | - | - |
| | 200 | - | 6-18 | 16 | 200 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 7 | 7(3.5) | 1 | 0.0 | - | - |
| MMC | 0.1 | - | 6-18 | N.D. | 200 | 13 | 44 | 2 | 0 | 0 | 59 | 55(27.5) | 0 | 0.0 | + | - |
| Vehicle ^{a)} | 0 | + | 6-18 | 100 | 200 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 3(1.5) | 0 | 0.0 | - | - |
| Test Substance | 200 | + | 6-18 | 85 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1(0.5) | 0 | 1.0 | - | - |
| | 225 | + | 6-18 | 67 | 200 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 3(1.5) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 250 | + | 6-18 | 59 | 200 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3(1.5) | 0 | 0.5 | - | - |
| | 275 | + | 6-18 | 41 | 200 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 4 | 4(2.0) | 1 | 1.0 | - | - |
| | 300 | + | 6-18 | 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1(1.0) | 1 | 1.0 | - | - |
| BP | 20 | + | 6-18 | N.D. | 200 | 9 | 133 | 4 | 0 | 0 | 146 | 135(67.5) | 0 | 0.0 | + | - |

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control), BP:benzo [a] pyrene(positive control)
 N.D.:Not determined

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) The same number of cells as those used in the structural aberration analysis were analyzed.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.*(1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt for 24 hr without S9 mix (main test)

| Group | Concentration (μg/mL) | Time of exposure (hr) | Cell growth index (%) | Number of cells analyzed | Number of structural aberrations | | | | | | Number of cells with aberrations (%) | Number of gaps | polyploid ^{b)} (%) | judgement ^{c)} | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|----|
| | | | | | ctb | cte | csb | cse | frg | total | | | | SA | NA |
| Vehicle ^{a)} | 0 | 24 | 100 | 200 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 (1.0) | 0 | 0.0 | - | - |
| Test Substance | 50 | 24 | 68 | 200 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 5 | 5 (2.5) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 75 | 24 | 65 | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 (0.5) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 100 | 24 | 58 | 200 | 0 | 1 | 4 | 1 | 0 | 6 | 6 (3.0) | 1 | 0.0 | - | - |
| | 125 | 24 | 53 | 200 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 (1.0) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 150 | 24 | 30 | Tox | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.05 | 24 | N.D. | 200 | 12 | 39 | 2 | 1 | 0 | 54 | 49(24.5) | 0 | 0.0 | + | - |

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control)

N.D.:Not determined

Tox:Because of cytotoxicity, 50 metaphase cells per dish could not be obtained.

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) The same number of cells as those used in the structural aberration analysis were analyzed.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 3 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt for 24 hr without S9 mix (additional test)

| Group | Concentration (μg/mL) | Time of exposure (hr) | Cell growth index (%) | Number of cells analyzed | Number of structural aberrations | | | | | | Number of cells with aberrations (%) | Number of gaps | polyploid ^{b)} (%) | judgement ^{c)} | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|----|
| | | | | | ctb | cte | csb | cse | frg | total | | | | SA | NA |
| Vehicle ^{a)} | 0 | 24 | 100 | 200 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 (1.0) | 0 | 0.5 | - | - |
| Test Substance | 100 | 24 | 67 | 200 | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | 6 | 6 (3.0) | 1 | 0.0 | - | - |
| | 110 | 24 | 49 | 200 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | 4 (2.0) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 120 | 24 | 47 | 178 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 (0.6) | 0 | 0.0 | - | - |
| | 130 | 24 | 40 | Tox | | | | | | | | | | | |
| | 140 | 24 | 31 | Tox | | | | | | | | | | | |
| | 150 | 24 | 31 | Tox | | | | | | | | | | | |
| MMC | 0.05 | 24 | N.D. | 200 | 12 | 56 | 2 | 0 | 0 | 70 | 66(33.0) | 2 | 0.0 | + | - |

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control)

N.D.:Not determined

Tox:Because of cytotoxicity, 50 metaphase cells per dish could not be obtained.

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) The same number of cells as those used in the structural aberration analysis were analyzed.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムのラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test
of *N*-(Carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt
by Oral Administration in Rats

要約

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムはカルボキシベタイン型の両性界面活性剤で、繊維仕上げ剤、化粧品、シャンプー、医薬品、金属イオン封鎖剤等の幅広い分野で使用されている¹⁾。毒性情報として、OECD TG423で実施した経口投与による急性毒性試験ではCategory 4(>300-2000)に分類された²⁾。しかし、反復投与および生殖発生毒性についての知見はない。

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムを10, 60および300 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(1群雌雄各12匹, 雌はサテライト動物として対照群および300 mg/kg群に各5匹を追加)に交配前14日から交配を経て雄は42日間, 雌は妊娠, 分娩を経て哺育4日, 雌サテライト動物は雄と同様に42日間までそれぞれ経口投与し, 反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

死亡が妊娠20日および23日に各1例, 流産が雌雄全例でいずれも300 mg/kg群で認められた。病理学検査の結果, 被験物質に起因する変化として, 剖検では前胃粘膜の肥厚, 黄色化および隆起巣, 組織学検査では扁平上皮過形成, 角化亢進, 錯角化, び慢性炎症性細胞浸潤, びらんおよび粘膜下織の水腫が300 mg/kg群の雌雄で認められた。また, 腎臓の尿細管上皮の壊死および腎盂上皮の過形成, 膀胱の粘膜上皮過形成が60および300 mg/kg群の雌雄で認められた。血液生化学検査では, 尿素窒素の増加が300 mg/kg群の雌雄で認められた。

投与期間で認められた変化は2週間の回復期間により消失するか, 変化がみられても病変程度が明らかに軽減していることから, 回復傾向を示しているものと判断された。

2. 生殖発生毒性

全出産児死亡が哺育0日に1例, 妊娠期間の延長, 出産児数の減少, ならびに出生率の低下が300 mg/kg群で認められた。その他, 親動物では性周期, 交尾率, 受胎率, 分娩率, 黄体数, 着床数および着床率, 新生児では性比, 新生児の4日生存率, 外表, 一般状態, 体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から, *N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムの本試験条件下における反復投

与毒性に関する無毒性量は雌雄とも10 mg/kg/day, 生殖発生毒性に関する無毒性量は雄親動物で300 mg/kg/day, 雌親動物ならびに児動物では60 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

N-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウム(花王, 東京), ロット番号3047, 純度27.1%は, 石油エーテル可溶分0.1%, 乾燥減量65.8%, 強熱残分7.0%を有する透明液体である。被験物質は室温, 暗所, 密栓容器にて保存し, 試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製には, 被験物質の有効成分の純度が27.1%であることから, 所定量の3.7倍を秤量し, 媒体(日本薬局方注射用水, 大塚製薬工場)に溶解させた。投与液中の被験物質の安定性を投与開始前に調製後8日間安定であることを確認した。投与液は投与に供するまで冷蔵・遮光・密栓保存条件下で保存し, 調製後7日以内に使用した。また, 初回および最終調製時に投与液中の被験物質濃度が設定濃度±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー(厚木生産所)から入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD(SD)IGS,SPF)を5日間検疫・馴化した。その後も馴化を継続し雌雄の一般状態, さらに雌は性周期を7日間観察し, 異常のない動物を試験に供した。投与開始前日に体重層別化無作為抽出法により, 1群あたり雌雄各12匹に振り分けた。さらに, 雌サテライト動物(回復動物)として対照群および300 mg/kg群に各5匹の雌を追加した。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢, 体重範囲は雄318~381 g, 雌が197~250 gであった。検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて, 温度22±3°C, 相対湿度55±20%, 換気約6~20回/時, 照明12時間/日(7:00-19:00)に自動調節した飼育室を使用した。動物飼育には, 妊娠・哺育期間を除く期間はステンレス製つり下げ式金網製ケージを, 妊娠・哺育期間には実験動物用床敷(ベータチップ, 日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージを使用した。交配期間は雌雄各1匹, 哺育期間は1腹, 検疫・馴化期間を含むその他の期間は1匹ずつ収容した。動物にはオートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業)と, 5 μmのフィルター濾過後,

紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与用量は用量設定試験の結果を参考に決定した。すなわち被験物質を0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で、1群雌雄各3匹のSD系ラットに14日間反復経口投与した。その結果1000 mg/kg群の雌雄全例で死亡するか、あるいは瀕死期解剖された。300 mg/kg群では流涎が雌雄の全例、赤血球数の低値が雌、前胃の水腫あるいは肥厚が雌雄に認められた。30および100 mg/kg群では被験物質に起因する変化は認められなかった。これらの結果および本試験の投与期間を考慮し、本試験の高用量は明らかな毒性発現が予想される300 mg/kgとし、以下公比約5で中用量は60 mg/kg、低用量は10 mg/kgの3用量を設定した。また、媒体(日本薬局方注射用水)のみを投与する対照群を設けた。

投与経路は経口とした。投与期間について、雄は交配前14日間および交配期間を経て剖検前日までの計42日間、雌は交配前14日間、交配期間、妊娠期間および分娩を経て哺育4日までとした。分娩しなかった雌は剖検前日までとした。なお、雌サテライト動物は交配は行わず雄と同様に42日間投与した。また、対照群と300 mg/kg群の雄各5匹および同群の雌サテライト動物各5匹は、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

投与の際はテフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は4 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査項目

1) 一般状態

全例について、生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。回復動物は1日1回午前中に観察した。

2) 行動検査

雌雄全例について、詳細な症状観察(ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールドでの観察)を、投与開始前日に1回、投与期間中は1回/週、いずれも午後に行った。雌雄とも各群5匹を選抜し、機能検査(刺激に対する反応性、握力)および自発運動の測定を、第6週の午後に1回行った。握力はデジタルフォースゲージ(DPS-5)、自発運動量にはSUPERMEX(室町機械)を用いて測定した。投与期間中の検査で被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、回復期間の検査は行わなかった。

3) 体重および摂餌量

雄では第1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 42および43日、さらに雄回復動物では第50および56日に測定した。雌サテライト動物は雄と同様の頻度で測定した。雌では第1, 4, 8および15日、交尾した雌は妊娠0, 7, 14および20日、分娩した雌は哺育0および4日に測定した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定し、各測定日間

の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。

4) 血液学検査

雄では第42日、雄回復動物および雌サテライト動物では第56日、雌では哺育4日に、全生存動物を午後4時頃より絶食させた。測定対象動物(採血動物)は、雄は5例、雄回復動物および雌サテライト動物は全例、雌は分娩日の順に5例とした。これらの動物は、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて以下に示す項目を測定した。

EDTA-2Kにより抗凝固処理し、赤血球数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、ヘモグロビン濃度(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(球状化処理二次元レーザーFCM法)、網赤血球数(RNA染色によるレーザーFCM法)、血小板数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、白血球数(酸性界面活性剤によるレーザーFCM法)を多項目自動血球分析装置(ADVIA120, バイエルメディカル)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-50, HEG-50 VFオムロン)を用いて測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。血液の一部を3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理し、遠心分離して得られた血漿を用いてプロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)(光散乱検出方式)を血液凝固自動分析装置(CA-510, シスメックス)を用いて測定した。

5) 血液生化学検査

計画解剖日に採取した血液の一部を室温・遮光下で約30分間静置後遠心分離し、得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

GOTおよびGPT(UV-rate法(JSCC改良法)), γ -GT(γ -グルタミン-p-ニトロアニリド基質法(SSCC改良法)), ALP(p-ニトロフェニルリン酸基質法(JSCC改良法)), 総ビリルビン(酵素法(BOD法)), 尿素窒素(酵素-UV法(Urease-LEDH法)), クレアチニン(酵素法(Creatininase-POD法)), グルコース(酵素-UV法(HK-G6PDH法)), 総コレステロール(酵素法(CO-HDAOS法)), トリグリセライド(酵素法(GPO-HDAOS法, グリセリン消去法)), 総蛋白(Biuret法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出), カルシウム(OCPC法), 無機リン(酵素法(PNP-XOD-POD法)), ナトリウム, カリウムおよびクロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(TBA-200FR, 東芝)を用いて測定した。

6) 雄の尿検査

雄について、第38日の投与前に各用量群5匹の新鮮尿を採取し、pH, 蛋白, グルコース, ケトン体, ビリルビン, 潜血およびウロビリノーゲン(試験紙法, マルティスティックス:バイエルメディカル)を自動尿分析器(ク

リニテック100, バイエル メディカル)により測定した。被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、尿沈渣、蓄積尿を用いた検査、回復動物の尿検査は行わなかった。

7) 病理学検査

雌雄全例について、解剖日にチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、腹大動脈の切断・放血により安楽死させて解剖した。計画解剖動物のうち、血液学検査の対象動物と同じ雌雄5匹(回復・サテライト動物は全例)の脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。ただし、精巣および精巣上体は雄全例について測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに雌雄全例については上記の器官に加えて、下垂体、リンパ節(下顎・腸間膜)、気管、肺、胃、腸管(十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸)、甲状腺・上皮小体、膀胱、精のう、前立腺腹葉、卵巣、子宮、膣、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、脊髄および肉眼的異常部位を採取し、10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定して保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で固定後、保存した。病理組織学検査は、対照群と300 mg/kg群の投与後解剖動物のうち、雌雄各5例(血液学検査および器官重量測定対象動物と同様)の上記器官、死亡動物および全出産児が死亡した母動物の上記器官、対照群を含む全動物の肉眼的異常部位および非妊娠雌1例の卵巣について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。この結果、被験物質に起因すると思われる変化が雌雄の胃、腎臓、膀胱および雌の胸腺と十二指腸に認められた。このため、10および60 mg/kg群の上述の基準で選択した各5例と回復後解剖動物の雌雄全例の当該器官・組織の検査を行った。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能検査

投与開始日から交配開始日まで雌の膣垢を毎日午前中に採取、性周期を検査し、平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配对を設け、第15日(交配開始日)の16:00頃から4日間昼夜同居させた。交尾確認は毎日午前中に行い、膣栓形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交配した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配開始後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率 $[(交尾動物数/同居動物数) \times 100]$ 、受胎率 $[(受胎動物数/交尾動物数) \times 100]$ を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。交尾確認後25日を経ても分娩しない場合は、非分娩雌とした。

分娩した動物は新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。母動物は剖検時に卵巣および子宮を摘出し、黄体数および着床数を検査した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から分娩完了日までの期間)、出産率 $[(生児出産雌数/受胎雌数) \times 100]$ 、着床率 $[(着床数/黄体数) \times 100]$ 、分娩率 $[(総出産児数/着床数) \times 100]$ を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出產生児数、死産児数)、性別および外表異常の有無を検査した。その後は、一般状態、死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率 $[(出產生児数/総出産児数) \times 100]$ 、新生児の4日の生存率 $[(哺育4日生存児数/出產生児数) \times 100]$ を算出した。

(2) 体重

生後0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。

(3) 剖検

生後4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後、親動物と同様に安楽死させ、剖検した。死亡動物については10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬、固定した後、実体顕微鏡下で剖検した。なお、分娩途中で死亡した母動物から出産された新生児のうち、生存している新生児も同様に安楽死させた後、剖検した。

6. 統計解析

計量データについて、パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析を行った。分散が等しくない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意差が認められた場合はDunnnett法またはDunnnett型の多重比較を行った。計数データのうち尿検査はKruskal-Wallisの検定を行い、有意差が認められた場合はDunnnett型の多重比較を、病理組織所見はWilcoxonの順位和検定で対照群との2群間比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。各検定の有意水準は5%とした。新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

死亡が300 mg/kgの雌で2例、全出産児死亡が同群の1例で認められた。死亡動物の1例は妊娠20日に、他の1例は妊娠22日から分娩を開始し、妊娠23日の分娩途中で死亡した。全出産児死亡の1例は、分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日、難産)を要し、分娩完了時には出産児が全例死亡していたため瀕死期解剖とした。

投与後の症状として、300 mg/kg群では流涎が第7日

から観察され、剖検までの間に雌雄全例で認められた。鼻周囲あるいは下腹部の汚れが同群の雌雄各2例でみられ、雌2例の内1例は難産を示した動物、他1例は分娩途中で死亡した動物であった。軟便が300 mg/kg群の雄1例に認められた。

2) 行動検査

詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定のいずれも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

3) 体重 (Fig. 1, 2)

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

4) 摂餌量

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

なお、投与期間では摂餌量の有意な低値が10および300 mg/kg群の雄の第38日に認められたが、60 mg/kg群で変化がないこと、さらに実験期間を通してみると摂

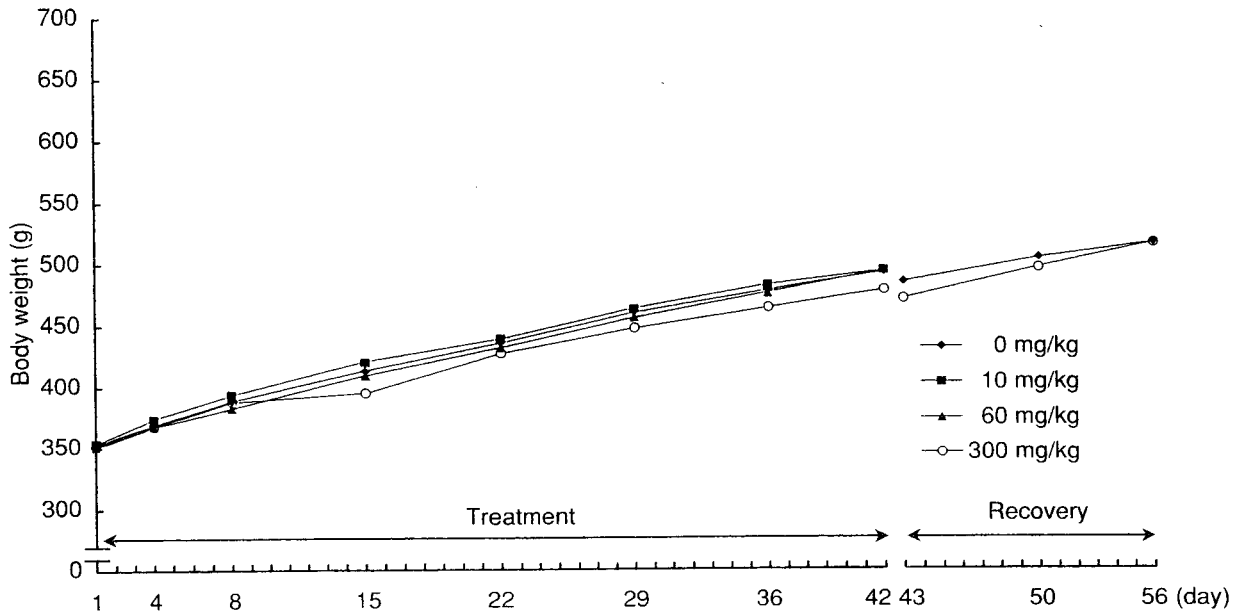


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

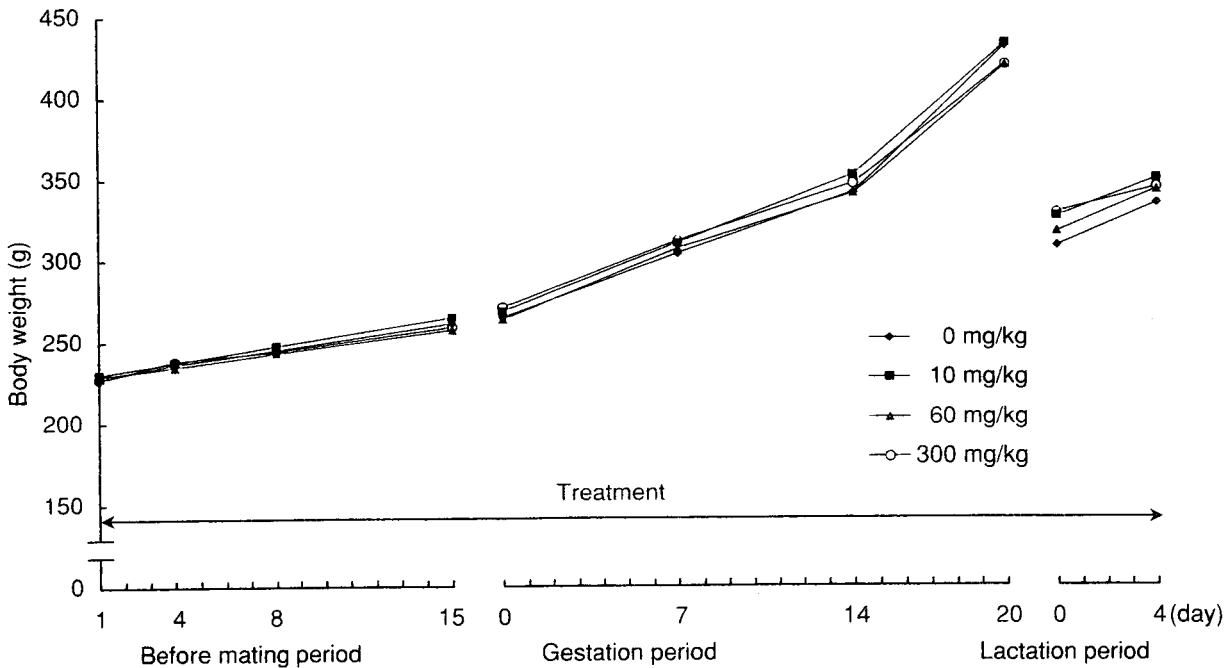


Fig. 2-1 Body weight changes of female rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

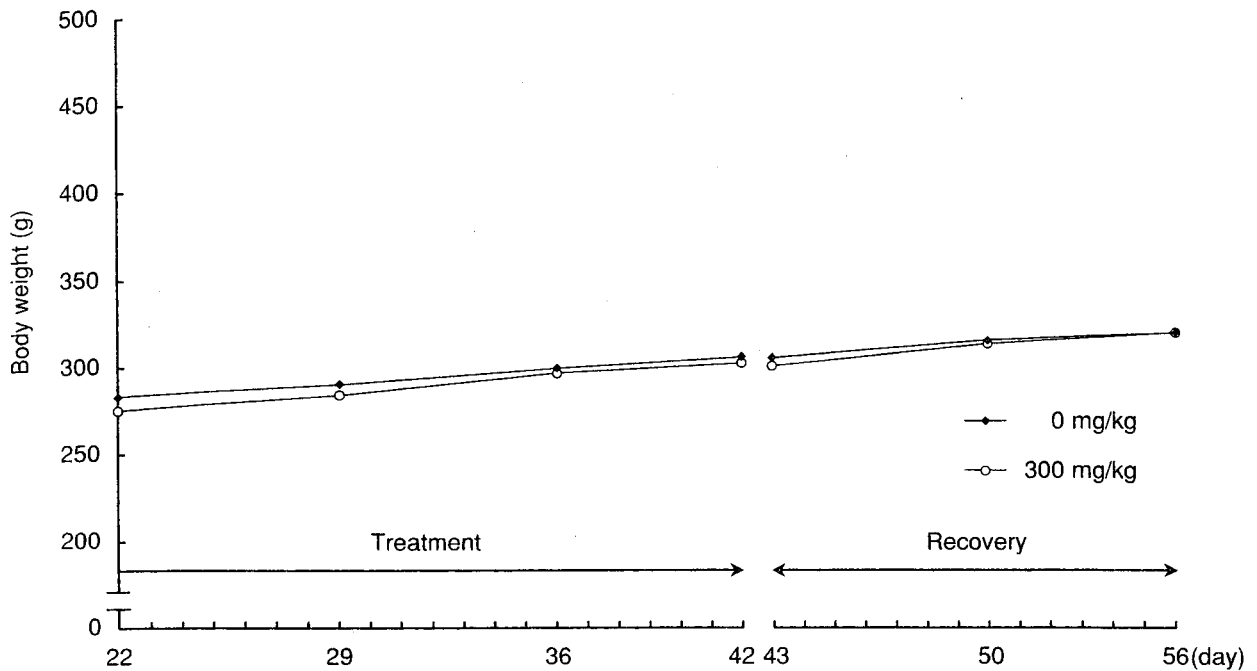


Fig. 2-2 Body weight changes of female rats (satellite animal) treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

餌量の低値は一過性的変化であることから、被験物質に関連するものではないと考えられる。回復期間では摂餌量の有意な高値が300 mg/kg群の雄の第50日にみられたが、投与期間中の摂餌量と同程度と判断され、偶発的な変化と考えられる。雌では投与および回復期間のいずれにも変化は認められず、対照群と同様に推移した。

5) 血液学検査 (Table 1)

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

10 および300 mg/kg群の雄のプロトロンビン時間が対照群の22.50 secに対し、それぞれ17.94 secおよび17.86 secと有意な低値を示した。しかし、当研究所の背景データ(平均18.51 sec<Min-Max, 17.07-20.50 sec>, 2000-2003年)から、10 および300 mg/kg群の値は背景データ内の変動であり、対照群の値が高値を示したものと思われ、被験物質と関連のない偶発的な変化と考えられる。また、300 mg/kg群の雌の回復終了後検査では好酸球比率の有意な低値が認められたが、投与終了後検査では変化がなかったことから、偶発的な変化と考えられる。

6) 血液生化学検査 (Table 2)

被験物質の影響と考えられる変化が、300 mg/kg群の雌雄で尿素窒素の高値、同群の雌でカルシウムの高値が認められた。

投与終了後検査では10 mg/kg群の雄でγGTおよびクレアチニンの有意な高値が認められたが、60および300 mg/kg群では変化がなく用量との関連がないことから、被験物質に起因する変化ではないと考えられる。

7) 雄の尿検査 (Table 3)

被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

8) 器官重量 (Table 4)

被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

9) 剖検所見

被験物質の影響と考えられる変化が300 mg/kg群の雌雄の胃に認められた。

前胃粘膜の肥厚が投与後解剖動物の300 mg/kg群で雄7例雌6例に認められた。このうち、雄4例では同部位粘膜の黄色化を伴っていた。前胃粘膜の隆起巣が投与後解剖動物の300 mg/kg群の雌1例で認められた。回復後解剖動物では、これらの変化は認められなかった。

死亡動物の剖検では、投与後解剖動物と同様に前胃粘膜の肥厚が2例に認められた。その他、1例では下垂体の腫大が認められた。全出産児が死亡した動物の剖検では、前胃粘膜の肥厚および胸腺の萎縮が認められた。

生殖器系への変化として、片側性の精巣上体尾部の黄色斑が対照群および60 mg/kg群の雄各1例、片側性の精巣および精巣上体の小型が対照群の雄1例、両側性の精巣および精巣上体の小型が300 mg/kg群の雄1例に認められた。本所見は用量に関係なくみられ、雌との交尾も全例で成立した。ただし、両側性の精巣および精巣上体の小型を示した300 mg/kg群の雄1例の相手雌は受胎しなかった。

10) 病理組織所見 (Table 5)

被験物質の影響と考えられる変化が300 mg/kg群の雌雄の胃、60および300 mg/kg群の雌雄の腎臓ならびに膀胱に認められた。

前胃: 扁平上皮過形成が投与後解剖動物の300 mg/kg群の雄3例雌1例で軽度、雄3例雌6例で中等度、雄1例で重度に認められた。300 mg/kg群ではこれに伴い、角化亢進が雄3例雌7例で軽度、雄3例で中等度、錯角化が雄4例雌2例で軽度、び慢性炎症性細胞浸潤が雄5例雌6例で軽度、雌雄各1例で中等度、粘膜下織の水腫が雌雄各5例で軽度、雄1例で中等度に認められた。また、びらんが300 mg/kg群の雌雄各3例で軽度に認められた。回復後解剖動物ではこれらの変化のうち、300 mg/kg群の雄1例に扁平上皮過形成が軽度に認められたのみであった。

腎臓: 細胞質の強好酸性化、核濃縮および尿細管腔内への脱落を特徴とする尿細管上皮の変性/壊死が、投与後解剖動物の60および300 mg/kg群の雌各4例で軽度に認められた。この変化は、回復後解剖動物では認められなかった。腎盂上皮の過形成が60 mg/kg群の雄4例雌1例、300 mg/kg群の雌雄各3例で軽度に認められた。この変化は回復後解剖動物では300 mg/kg群の雌1例に軽度に認められたのみであった。

膀胱: 粘膜上皮の過形成が60 mg/kg群の雌雄全例で軽度、300 mg/kg群の雌雄全例で中等度に認められた。この変化は、回復後解剖動物でも300 mg/kg群の雌雄全例で軽度に認められた。

剖検時に認められた片側性の精巣上体尾部の黄色斑は精子肉芽腫、片側性の精巣の小型は限局性精細管萎縮、それに伴う精巣上体の小型は腔内精子減少、両側性の精巣の小型はび慢性精細管萎縮、それに伴う精巣上体の小型は腔内精子減少であった。

死亡動物では、被験物質に起因する変化として、前胃の扁平上皮過形成、角化亢進およびびらん、錯角化が雌2例ともにみられ、加えて1例では膀胱の粘膜上皮の過形成、胸腺の萎縮も認められた。なお、死後の自己融解が強く2例の腎臓、1例の膀胱は評価できなかった。その他、個々に認められた所見として1例では、気管に重度の粘膜上皮の壊死と中等度の固有層の炎症性細胞浸潤、肺に中等度のうっ血と軽度の水腫が認められた。他の1例では、肺の静脈および肝臓の中心静脈に血栓が認められ、死因として播種性血管内凝固症候群(DIC)が疑われた。この他、胸腺および子宮における出血、脾臓の白脾髄の萎縮、副腎の限局性壊死が認められた。なお、剖検でみられた下垂体の腫大は、特記すべき組織学的変化は認められなかった。

全出産児が死亡した動物では、被験物質に起因する変化として、前胃の扁平上皮過形成、角化亢進、錯角化、びらんおよび炎症性細胞浸潤、腎臓の尿細管上皮の変性/壊死および腎盂上皮の過形成、膀胱の粘膜上皮の過形成および胸腺の萎縮が認められた。この他、腺胃粘膜の萎縮、肝臓の肝細胞および腎臓の近位尿細管に脂肪滴と思われる空胞化、副腎の束状帯の過形成が認められた。

なお、十二指腸粘膜上皮の過形成が認められ、被験物質の影響を疑ったが、投与後解剖動物および回復後解剖動物でこの変化は認められなかった。

雌の胸腺で被験物質の影響を疑い、10および60 mg/kg群ならびに回復後解剖動物の胸腺も合わせて精査したが、対照群との差は認められなかった。300 mg/kg群の雌で認められた胸腺の萎縮は、死亡および全出産児動物に限られた衰弱性の変化と考えられる。

この他にもいくつかの変化が認められたが、ラットでは非特異的に発現する変化であり、その発現状況に明らかな群差がみられないことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 6)

性周期検査では、4日周期を示した動物が対照群、10、60および300 mg/kg群でそれぞれ各群12例中、12、11、12および10例であり、被験物質投与による性周期の延長あるいは短縮は認められなかった。なお、300 mg/kg群の1例で発情休止期の継続がみられたが、雄との同居後に性周期が回復し交尾した。その他に、異常性周期を示す動物は認められなかった。

各群の全例が交尾し、交尾率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。非妊娠の動物は300 mg/kg群の1例にみられただけで、受胎率にも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。なお、非妊娠雌の相手雄は両側性の精巣および精巣上体の小型がみられ、非妊娠は雄が原因と考えられたが、本所見は稀にみられる変化で、被験物質による影響ではないと考えられる。

2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

妊娠期間の延長および出産児数の低値が300 mg/kg群で認められた。その他、黄体数、着床数、着床率、出生率および分娩率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

分娩状態の観察で300 mg/kg群の2例に以下の変化が認められた。1例では、妊娠22日の分娩途中の観察で出産児5例が娩出されていたが、翌日には7例の死亡児が確認され、母動物も死亡していた。この母動物の子宮内には5例の胎児が遺残していた。また、娩出された出産児の内3例は母動物の死亡発見時には生存していた。他の1例は、分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日)を要し難産を示した母動物であった。本母動物では妊娠23日に16例の出産児が観察されたが、触診の結果、子宮内に遺残している胎児が確認されたため観察を続けた。妊娠24日の観察時にはすべての胎児が娩出されたが、全出産児は死亡していた。この母動物は授乳、胎盤摂取、児動物を回集するなどの哺育行動が認められなかった。その他の母動物に分娩および哺育行動の異常は認められなかった。

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 新生児の観察 (Table 7)

300 mg/kg群で出産児数の低値を示し、それに伴い出生率も低値傾向を示した。なお、性比に変化は認められなかった。

一般状態および外表異常の観察では、被験物質に起因する変化は認められなかった。

(2) 体重 (Table 7)

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質投与群に変化は認められなかった。

(3) 剖検

哺育4日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

死亡が300 mg/kgの妊娠20日に雌1例、妊娠23日の分娩途中に雌1例で認められた。投与後の症状として、流涎が300 mg/kg群の雌雄全例に認められた。被験物質はウサギの眼粘膜に対し強い刺激性を有することか知られている³⁾こと、被験物質投与による神経症状が認められていないことから、流涎は被験物質の刺激性に起因する変化と考えられる。

病理学検査の結果、被験物質に起因する変化が胃、腎臓および膀胱に認められた。剖検において前胃粘膜の肥厚、黄色化および隆起巣が300 mg/kg群の雌雄でみられ、組織学的には扁平上皮過形成、角化亢進、錯角化、び慢性炎症性細胞浸潤、びらんおよび粘膜下織の水腫が同群の雌雄で認められた。その他、腎臓の尿細管上皮の壊死および腎盂上皮の過形成、膀胱の粘膜上皮過形成が60および300 mg/kg群の雌雄で認められた。

前胃の扁平上皮過形成は、種々の刺激性化学物質の経口投与によって誘発され、角化亢進や炎症性細胞浸潤、水腫を伴うこともあり、投与を中止することにより回復することが報告されている⁴⁾。胃の変化は、上述のように流涎が300 mg/kg群の全例で認められていることから、被験物質の刺激性に起因する変化と考えられる。腎臓の尿細管上皮の壊死は多くの薬物によって誘発され、その機序は様々である⁴⁾。壊死は近位尿細管に見られることが多く⁵⁾、本試験での発現部位はそれに一致していた。膀胱の粘膜上皮過形成は、種々の原因による移行上皮の損傷部における再生像として認められる⁶⁾。被験物質は消毒剤に用いられ殺菌力が強力であることが知られている⁷⁾こと、両性界面活性剤のうち市販殺菌消毒剤の代謝についての実験では、高用量投与における排泄は主として腎臓より行われる⁷⁾ことから、腎臓および膀胱の変化は被験物質により誘発されたものと考えられる。

血液生化学検査では、尿素窒素の増加が300 mg/kg群の雌雄で認められた。血清尿素は腎機能の指標として用いられており⁸⁾、前述のように腎臓への影響が組織学的にみられていることから、それに伴う増加と考えられる。

これら投与期間で認められた変化は、2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が明らかに軽減し、回復傾向を示しているものと考えられる。

分娩途中で死亡した300 mg/kg群の1例では、交配前に一過性的変化として鼻周囲および下腹部の汚れ、性周期検査で発情休止期の継続、剖検では前胃粘膜の肥厚、組織学的には、被験物質に起因する前述の変化の他、肺の静脈および肝臓の中心静脈に血栓が認められた。周産期に死亡した動物を組織検査すると、静脈に血栓がみられ、播種性血管内凝固症候群(DIC)を呈することがしばしば認められる。本動物も同様の変化を示していることから、死因として播種性血管内凝固症候群(DIC)の可能性が示唆された。他の死亡動物では、被験物質に起因する前述の変化の他、病理組織学検査では気管に重度の粘膜上皮の壊死と中等度の固有層の炎症性細胞浸潤、肺に中等度のうっ血と軽度の水腫が認められた。また、本死亡動物は死亡前日に流涎が観察されていたことから、流涎の発症と気管・肺の組織学的変化から誤嚥した可能性が考えられ、死亡したものと推察された。

雄の生殖器系への変化として、精巣および精巣上体の小型および精細管萎縮などが認められたが、本系統の動物でしばしば観察される自然発生の性的変化と考えられ、さらに用量に関係なくみられていることから、被験物質に起因するものではないと判断した。その他、体重、摂餌量、血液学検査、尿検査(雄)および器官重量では、被験物質に起因する影響は認められなかった。また、詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定でも被験物質の影響はなく、神経症状を示唆する変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

全出産児死亡が300 mg/kg群の雌1例の哺育0日に認められた。本動物は分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日)を要し難産を示し、分娩完了の観察時には全出産児が死亡していた。分娩途中の観察においても、授乳、胎盤摂取あるいは児動物を回集するなどの哺育行動が認められなかった。また、妊娠期間の延長および出産児数の減少が300 mg/kg群で認められた。300 mg/kg群の雌では妊娠末期の死亡、分娩途中の死亡、全出産児死亡がみられ、いずれも周産期に集中して認められていることから、妊娠期間の延長や出産児数の減少を招いたものと考えられる。この他、性周期、交尾率、受胎率、分娩率、黄体数、着床数、着床率および出産率では被験物質に起因する変化は認められなかった。

新生児の検査において、出産児数が300 mg/kg群で減少し、それに伴い出生率も低値傾向を示した。生後4日の生存率、性比、外表、一般状態、体重および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、出産児数の減少がみられたが、次世代の発育へ影響を及ぼすものではないと考えられる。

以上のように、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカニウムを反復経口投与した結果、一般毒性

学的な主な変化として300 mg/kg群で周産期における雌の死亡、雌雄全例に流産がみられ、前胃粘膜の肥厚と組織学的には扁平上皮過形成が認められた。60および300 mg/kg群の雌雄では腎臓の尿細管上皮の壊死および膀胱の粘膜上皮過形成が認められ、加えて血清尿素窒素の高値が300 mg/kg群の雌雄で認められた。これら投与期間で認められた変化は2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が軽減し、回復傾向を示しているものと判断された。生殖発生毒性に及ぼす影響として、300 mg/kg群で全出産児死亡、妊娠期間の延長、出産児数の減少が認められた。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無毒性量は雌雄とも10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無毒性量は雄親動物で300 mg/kg/day、雌親動物ならびに児動物では60 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 「13901の化学商品」化学工業日報社、東京(2001) pp.1262-1264.
- 2) 星野信人ら:N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカニウムノラットを用いる単回経口投与毒性試験. 化学物質毒性試験報告, 13: 85-86 (2006).
- 3) アンヒトール24B. 製品安全性データシート, 花王(2003).
- 4) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ: The alimentary system and pancreas. Stomach. In "Atlas of experimental toxicological pathology", Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ (ed), MTP Press, Lancaster (1987) pp.64-65.
- 5) 渡辺満利, 西川秋佳:腎臓. 非腫瘍性病変. 尿細管上皮細胞の壊死. In「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集), 日本毒性病理学会, 名古屋(2000) p.254.
- 6) 福島昭治:膀胱/尿管/尿道. 増殖性および腫瘍性病変. 膀胱. 過形成. In「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集), 日本毒性病理学会, 名古屋(2000) p.272.
- 7) 界面活性剤の安全性および生分解性に関するデータシート集(第4集), 日本界面活性剤工業界, 東京(1988) pp.168-170.
- 8) 河合忠, 屋形稔, 伊藤喜久:「異常値の出るメカニズム」医学書院, 東京(2001) p.119.

連絡先

試験責任者: 星野信人
 試験担当者: 佐藤ゆかり, 藤代真弓, 小山 隆
 爰島洋子, 豊田直人
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-0255 茨城県神栖市砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Nobuhito Hoshino (Study director)
 Yukari Sato, Mayumi Fujishiro,
 Takashi Koyama, Hiroko Kokoshima,
 Naoto Toyota
 Kashima Laboratory Mitsubishi Chemical Safety
 Institute Ltd.,
 14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255,
 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax+81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | Recovery period | |
|--------|--|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 |
| Male | | | | | | | |
| | Number of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 8.650 \pm 0.323 | 8.322 \pm 0.243 | 8.426 \pm 0.397 | 8.520 \pm 0.267 | 8.420 \pm 0.319 | 8.598 \pm 0.299 |
| | Hemoglobin (g/dL) | 15.50 \pm 0.51 | 15.14 \pm 0.19 | 15.36 \pm 0.71 | 15.30 \pm 0.41 | 15.02 \pm 0.47 | 15.08 \pm 0.47 |
| | Hematocrit (%) | 46.98 \pm 1.60 | 45.56 \pm 0.95 | 46.10 \pm 2.17 | 46.46 \pm 1.55 | 45.72 \pm 1.54 | 46.14 \pm 1.24 |
| | Reticulocyte (%) | 2.06 \pm 0.30 | 2.28 \pm 0.30 | 2.80 \pm 0.35 | 2.34 \pm 0.86 | 2.44 \pm 0.67 | 2.50 \pm 0.44 |
| | MCV (fL) | 54.38 \pm 2.08 | 54.68 \pm 1.15 | 54.74 \pm 2.29 | 54.56 \pm 1.81 | 54.36 \pm 1.96 | 53.72 \pm 1.59 |
| | MCH (pg) | 17.94 \pm 0.76 | 18.14 \pm 0.35 | 18.24 \pm 1.05 | 17.94 \pm 0.38 | 17.84 \pm 0.44 | 17.56 \pm 0.52 |
| | MCHC (%) | 33.02 \pm 0.43 | 33.16 \pm 0.54 | 33.32 \pm 0.85 | 32.92 \pm 1.02 | 32.86 \pm 0.43 | 32.70 \pm 0.22 |
| | Platelet ($\times 10^9/\mu\text{L}$) | 981.6 \pm 34.6 | 1101.8 \pm 153.2 | 995.6 \pm 140.4 | 1137.4 \pm 44.0 | 1064.2 \pm 217.9 | 1055.6 \pm 124.9 |
| | PT (sec) | 22.50 \pm 3.29 | 17.94 \pm 1.68* | 19.50 \pm 2.57 | 17.86 \pm 2.40* | 18.30 \pm 2.00 | 20.68 \pm 2.83 |
| | APTT (sec) | 21.26 \pm 1.18 | 20.24 \pm 1.00 | 21.84 \pm 1.67 | 19.96 \pm 1.75 | 20.26 \pm 1.15 | 20.76 \pm 1.17 |
| | WBC ($\times 10^9/\mu\text{L}$) | 10.352 \pm 3.403 | 8.772 \pm 1.252 | 9.260 \pm 2.759 | 9.792 \pm 1.142 | 10.000 \pm 3.524 | 8.914 \pm 3.208 |
| | Differential leukocyte counts (%) | | | | | | |
| | Lymphocyte | 82.60 \pm 8.26 | 83.72 \pm 3.38 | 79.16 \pm 15.79 | 78.84 \pm 4.84 | 84.36 \pm 5.27 | 86.74 \pm 4.38 |
| | Neutrophilie Segmented | 15.20 \pm 7.60 | 14.26 \pm 3.88 | 18.84 \pm 14.14 | 18.76 \pm 5.50 | 11.84 \pm 4.31 | 10.64 \pm 4.12 |
| | Neutrophilie Band | 0.20 \pm 0.45 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.40 \pm 0.55 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | Eosinophil | 0.80 \pm 0.84 | 0.60 \pm 0.89 | 0.80 \pm 0.84 | 1.00 \pm 0.71 | 1.40 \pm 0.89 | 1.20 \pm 0.84 |
| | Basophil | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | Monocyte | 1.20 \pm 1.10 | 1.42 \pm 0.94 | 1.20 \pm 1.10 | 1.00 \pm 1.00 | 2.40 \pm 1.14 | 1.42 \pm 1.18 |
| Female | | | | | | | |
| | Number of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 6.872 \pm 0.343 | 6.964 \pm 0.577 | 6.890 \pm 0.390 | 6.600 \pm 0.314 | 7.936 \pm 0.191 | 7.764 \pm 0.355 |
| | Hemoglobin (g/dL) | 13.10 \pm 0.62 | 13.36 \pm 0.95 | 13.30 \pm 0.70 | 12.88 \pm 0.40 | 14.88 \pm 0.55 | 14.62 \pm 0.13 |
| | Hematocrit (%) | 39.42 \pm 1.90 | 40.42 \pm 2.91 | 39.78 \pm 1.95 | 38.58 \pm 1.13 | 43.68 \pm 1.39 | 43.28 \pm 1.57 |
| | Reticulocyte (%) | 5.78 \pm 0.97 | 6.68 \pm 1.71 | 6.14 \pm 1.31 | 5.96 \pm 1.44 | 2.50 \pm 0.52 | 2.46 \pm 0.27 |
| | MCV (fL) | 57.38 \pm 0.44 | 58.12 \pm 2.49 | 57.78 \pm 1.11 | 58.50 \pm 1.69 | 55.04 \pm 2.06 | 55.76 \pm 1.48 |
| | MCH (pg) | 19.04 \pm 0.11 | 19.22 \pm 0.72 | 19.28 \pm 0.42 | 19.50 \pm 0.44 | 18.76 \pm 0.67 | 18.84 \pm 0.72 |
| | MCHC (%) | 33.20 \pm 0.12 | 33.04 \pm 0.32 | 33.38 \pm 0.23 | 33.38 \pm 0.31 | 34.06 \pm 0.47 | 33.78 \pm 1.16 |
| | Platelet ($\times 10^9/\mu\text{L}$) | 1193.4 \pm 75.7 | 1252.2 \pm 343.9 | 1213.0 \pm 67.5 | 1262.4 \pm 238.0 | 1142.2 \pm 125.4 | 1014.6 \pm 77.8 |
| | PT (sec) | 17.46 \pm 0.97 | 17.36 \pm 0.76 | 17.24 \pm 0.32 | 17.24 \pm 0.67 | 15.76 \pm 0.54 | 15.68 \pm 0.30 |
| | APTT (sec) | 16.44 \pm 1.48 | 14.48 \pm 2.16 | 15.72 \pm 2.37 | 14.96 \pm 1.61 | 16.56 \pm 0.91 | 16.86 \pm 1.40 |
| | WBC ($\times 10^9/\mu\text{L}$) | 10.658 \pm 2.458 | 10.866 \pm 2.816 | 11.242 \pm 2.694 | 10.522 \pm 3.663 | 6.080 \pm 1.416 | 6.224 \pm 2.337 |
| | Differential leukocyte counts (%) | | | | | | |
| | Lymphocyte | 75.10 \pm 11.00 | 66.86 \pm 7.61 | 75.00 \pm 12.14 | 63.14 \pm 11.29 | 84.50 \pm 5.86 | 85.38 \pm 2.69 |
| | Neutrophilie Segmented | 21.90 \pm 10.91 | 28.74 \pm 7.61 | 22.00 \pm 11.38 | 31.40 \pm 9.52 | 12.08 \pm 4.80 | 13.22 \pm 2.77 |
| | Neutrophilie Band | 0.60 \pm 0.55 | 0.20 \pm 0.45 | 0.40 \pm 0.89 | 1.02 \pm 2.28 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | Eosinophil | 0.80 \pm 0.84 | 1.80 \pm 0.84 | 1.40 \pm 0.89 | 0.80 \pm 0.45 | 1.60 \pm 1.14 | 0.20 \pm 0.45* |
| | Basophil | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| | Monocyte | 1.60 \pm 1.14 | 2.40 \pm 2.07 | 1.20 \pm 0.84 | 3.64 \pm 1.99 | 1.82 \pm 1.33 | 1.20 \pm 0.84 |

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; * p <0.05, ** p <0.01

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | Recovery period | |
|--------|-------------------------|-----------------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 |
| Male | | | | | | | |
| | Number of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | GOT (U/L) | 96.0 ± 19.9 | 105.4 ± 20.8 | 99.0 ± 11.3 | 92.4 ± 10.9 | 125.6 ± 29.5 | 148.0 ± 42.1 |
| | GPT (U/L) | 32.0 ± 7.9 | 30.0 ± 6.0 | 30.0 ± 4.0 | 28.2 ± 2.0 | 34.0 ± 9.2 | 50.2 ± 46.3 |
| | γGT (U/L) | 1.2 ± 0.4 | 2.0 ± 0.0* | 1.8 ± 0.4 | 1.0 ± 0.0 | 2.2 ± 1.1 | 1.6 ± 0.5 |
| | ALP (U/L) | 377.6 ± 58.0 | 395.4 ± 91.1 | 383.6 ± 51.3 | 304.8 ± 39.7 | 379.0 ± 67.3 | 381.2 ± 75.2 |
| | Total bilirubin (mg/dL) | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 |
| | Urea nitrogen (mg/dL) | 12.48 ± 0.93 | 13.08 ± 0.56 | 13.34 ± 1.37 | 16.76 ± 2.06** | 14.68 ± 2.07 | 14.04 ± 1.42 |
| | Creatinine (mg/dL) | 0.22 ± 0.04 | 0.30 ± 0.00* | 0.24 ± 0.05 | 0.28 ± 0.04 | 0.30 ± 0.00 | 0.26 ± 0.05 |
| | Glucose (mg/dL) | 125.8 ± 10.1 | 118.0 ± 13.7 | 121.6 ± 10.1 | 112.2 ± 13.7 | 125.2 ± 15.4 | 117.2 ± 4.2 |
| | Total chol. (mg/dL) | 62.0 ± 12.8 | 66.2 ± 13.8 | 63.8 ± 13.1 | 61.2 ± 7.9 | 67.2 ± 30.3 | 61.2 ± 12.0 |
| | Triglyceride (mg/dL) | 23.0 ± 8.1 | 20.2 ± 3.3 | 28.2 ± 12.2 | 24.4 ± 11.9 | 26.6 ± 9.9 | 44.0 ± 30.5 |
| | Total protein (g/dL) | 6.64 ± 0.19 | 6.94 ± 0.13 | 6.92 ± 0.42 | 6.70 ± 0.28 | 6.92 ± 0.37 | 7.00 ± 0.43 |
| | Albumin (g/dL) | 3.06 ± 0.15 | 3.08 ± 0.13 | 3.18 ± 0.20 | 3.08 ± 0.19 | 3.20 ± 0.10 | 3.28 ± 0.13 |
| | A/G ratio | 0.868 ± 0.098 | 0.790 ± 0.045 | 0.856 ± 0.095 | 0.854 ± 0.048 | 0.862 ± 0.095 | 0.878 ± 0.054 |
| | Calcium (mg/dL) | 9.98 ± 0.33 | 10.10 ± 0.21 | 10.22 ± 0.41 | 10.04 ± 0.37 | 10.02 ± 0.22 | 10.06 ± 0.31 |
| | Inorganic phos. (mg/dL) | 7.58 ± 0.32 | 7.54 ± 0.17 | 7.90 ± 0.17 | 7.82 ± 0.42 | 7.60 ± 0.42 | 7.78 ± 0.36 |
| | Na (mmol/L) | 146.8 ± 0.8 | 147.0 ± 1.0 | 147.4 ± 1.5 | 147.0 ± 1.0 | 147.0 ± 1.0 | 146.8 ± 1.3 |
| | K (mmol/L) | 4.52 ± 0.28 | 4.64 ± 0.15 | 4.58 ± 0.38 | 4.62 ± 0.20 | 4.40 ± 0.21 | 4.52 ± 0.27 |
| | Cl (mmol/L) | 105.0 ± 0.7 | 105.2 ± 0.8 | 105.6 ± 1.5 | 103.2 ± 2.4 | 103.4 ± 1.8 | 104.6 ± 1.1 |
| Female | | | | | | | |
| | Number of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | GOT (U/L) | 137.4 ± 22.2 | 117.8 ± 19.8 | 123.2 ± 19.0 | 132.0 ± 23.2 | 163.4 ± 77.1 | 127.8 ± 32.1 |
| | GPT (U/L) | 54.4 ± 16.6 | 47.6 ± 12.9 | 49.8 ± 7.2 | 79.8 ± 25.3 | 44.4 ± 30.0 | 30.0 ± 12.3 |
| | γGT (U/L) | 1.6 ± 0.9 | 1.8 ± 0.8 | 1.4 ± 0.5 | 2.0 ± 0.0 | 1.8 ± 0.4 | 1.8 ± 0.4 |
| | ALP (U/L) | 298.0 ± 45.7 | 259.6 ± 59.0 | 313.8 ± 196.4 | 401.0 ± 86.7 | 164.2 ± 60.1 | 138.4 ± 35.4 |
| | Total bilirubin (mg/dL) | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.10 ± 0.00 | 0.08 ± 0.04 | 0.14 ± 0.05 | 0.10 ± 0.00 |
| | Urea nitrogen (mg/dL) | 19.16 ± 1.69 | 20.56 ± 3.70 | 18.34 ± 2.02 | 26.66 ± 2.55** | 14.98 ± 2.70 | 18.68 ± 3.07 |
| | Creatinine (mg/dL) | 0.32 ± 0.04 | 0.30 ± 0.00 | 0.30 ± 0.00 | 0.36 ± 0.05 | 0.32 ± 0.04 | 0.38 ± 0.04 |
| | Glucose (mg/dL) | 121.8 ± 6.3 | 125.8 ± 6.2 | 122.0 ± 6.1 | 111.2 ± 10.1 | 135.4 ± 9.4 | 130.8 ± 14.7 |
| | Total chol. (mg/dL) | 77.8 ± 13.9 | 80.4 ± 14.3 | 64.8 ± 8.6 | 79.8 ± 14.4 | 79.4 ± 18.4 | 77.8 ± 23.8 |
| | Triglyceride (mg/dL) | 76.0 ± 68.8 | 70.6 ± 13.6 | 53.0 ± 24.8 | 62.0 ± 21.8 | 23.2 ± 6.8 | 20.6 ± 14.0 |
| | Total protein (g/dL) | 6.74 ± 0.33 | 6.94 ± 0.05 | 7.10 ± 0.19 | 6.92 ± 0.26 | 7.34 ± 0.39 | 7.48 ± 0.66 |
| | Albumin (g/dL) | 3.14 ± 0.18 | 3.30 ± 0.10 | 3.34 ± 0.21 | 3.16 ± 0.28 | 3.62 ± 0.27 | 3.64 ± 0.42 |
| | A/G ratio | 0.862 ± 0.038 | 0.906 ± 0.050 | 0.876 ± 0.076 | 0.850 ± 0.088 | 0.972 ± 0.067 | 0.950 ± 0.068 |
| | Calcium (mg/dL) | 10.70 ± 0.31 | 10.80 ± 0.33 | 11.02 ± 0.29 | 13.46 ± 4.45* | 10.22 ± 0.29 | 10.20 ± 0.47 |
| | Inorganic phos. (mg/dL) | 9.26 ± 0.31 | 9.16 ± 0.51 | 9.64 ± 1.17 | 9.96 ± 0.38 | 6.46 ± 0.68 | 6.44 ± 0.34 |
| | Na (mmol/L) | 145.0 ± 1.9 | 146.2 ± 1.8 | 146.4 ± 0.9 | 146.2 ± 1.3 | 146.0 ± 0.7 | 145.6 ± 1.5 |
| | K (mmol/L) | 4.46 ± 0.21 | 4.36 ± 0.17 | 4.32 ± 0.33 | 4.50 ± 0.25 | 3.94 ± 0.22 | 4.02 ± 0.26 |
| | Cl (mmol/L) | 101.8 ± 3.4 | 103.6 ± 2.1 | 104.4 ± 1.3 | 104.2 ± 1.8 | 106.2 ± 2.4 | 107.8 ± 1.5 |

Values are expressed as Mean ± S.D.
Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|----|----|-----|
| | | 0 | 10 | 60 | 300 |
| Male | | | | | |
| Number of animals | | 5 | 5 | 5 | 5 |
| pH | 5.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8.0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 8.5 | 5 | 4 | 2 | 3 |
| >=9 | 0 | 1 | 3 | 1 | |
| Protein | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | +/- | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1+ | 3 | 2 | 2 | 4 |
| | 2+ | 2 | 3 | 3 | 1 |
| | 3+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glucose | - | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | +/- | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ketones | - | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | +/- | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | 1+ | 4 | 3 | 3 | 3 |
| | 2+ | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | 3+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bilirubin | - | 4 | 3 | 3 | 4 |
| | 1+ | 1 | 2 | 2 | 1 |
| | 2+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Occult blood | - | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | +/- | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Urobilinogen (EU/dL) | 0.1 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | 1.0 | 5 | 3 | 5 | 3 |
| | 2.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | >=8 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Grade; -:negative, +/-:trace, 1+:slight, 2+:moderate, 3+:severe
Significantly different from 0 mg/kg group; *p<0.05, **p<0.01

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | Recovery period | |
|---------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------|----------------|
| | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 |
| Male | | | | | | | |
| | Number of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Final body weight (g) | 466.0 ± 61.0 (7) ^{a)} | 465.8 ± 36.3 (12) | 463.7 ± 39.4 (12) | 440.3 ± 32.8 (7) | 490.0 ± 19.8 | 484.2 ± 28.5 |
| | Absolute organ weight | | | | | | |
| | Brain (g) | 2.134 ± 0.098 | 2.150 ± 0.094 | 2.122 ± 0.025 | 2.066 ± 0.096 | 2.158 ± 0.100 | 2.090 ± 0.086 |
| | Thymus (mg) | 327.8 ± 25.9 | 339.2 ± 75.5 | 361.6 ± 163.6 | 232.8 ± 52.3 | 313.4 ± 53.3 | 301.2 ± 103.2 |
| | Heart (g) | 1.456 ± 0.094 | 1.512 ± 0.153 | 1.510 ± 0.170 | 1.474 ± 0.127 | 1.626 ± 0.163 | 1.584 ± 0.169 |
| | Liver (g) | 10.962 ± 1.354 | 11.216 ± 1.198 | 12.462 ± 2.432 | 11.244 ± 0.820 | 12.388 ± 1.914 | 12.982 ± 1.690 |
| | Spleen (g) | 0.700 ± 0.097 | 0.790 ± 0.039 | 0.882 ± 0.185 | 0.718 ± 0.088 | 0.808 ± 0.149 | 0.798 ± 0.094 |
| | Kidneys (g) | 2.976 ± 0.357 | 3.130 ± 0.199 | 2.996 ± 0.170 | 3.144 ± 0.276 | 3.246 ± 0.167 | 3.278 ± 0.179 |
| | Adrenals (mg) | 65.00 ± 16.68 | 68.68 ± 12.79 | 63.22 ± 5.53 | 68.56 ± 3.49 | 59.20 ± 11.37 | 57.62 ± 9.79 |
| | Testes (g) | 3.347 ± 0.316 (7) | 3.339 ± 0.358 (12) | 3.484 ± 0.262 (12) | 3.290 ± 0.740 (7) | 3.600 ± 0.349 | 3.628 ± 0.165 |
| | Epididymides (g) | 1.304 ± 0.108 (7) | 1.276 ± 0.116 (12) | 1.335 ± 0.056 (12) | 1.259 ± 0.254 (7) | 1.398 ± 0.112 | 1.442 ± 0.079 |
| | Relative organ weight | | | | | | |
| | Brain (g%) | 0.488 ± 0.047 | 0.458 ± 0.026 | 0.450 ± 0.054 | 0.474 ± 0.035 | 0.442 ± 0.029 | 0.432 ± 0.019 |
| | Thymus (mg%) | 74.96 ± 6.12 | 72.34 ± 16.33 | 74.70 ± 26.78 | 53.00 ± 9.59 | 63.98 ± 10.91 | 61.56 ± 17.86 |
| | Heart (g%) | 0.334 ± 0.039 | 0.322 ± 0.018 | 0.316 ± 0.009 | 0.338 ± 0.040 | 0.332 ± 0.031 | 0.326 ± 0.026 |
| | Liver (g%) | 2.492 ± 0.089 | 2.384 ± 0.118 | 2.600 ± 0.241 | 2.578 ± 0.176 | 2.524 ± 0.342 | 2.676 ± 0.241 |
| | Spleen (g%) | 0.160 ± 0.012 | 0.168 ± 0.015 | 0.186 ± 0.042 | 0.166 ± 0.023 | 0.164 ± 0.026 | 0.162 ± 0.019 |
| | Kidneys (g%) | 0.678 ± 0.034 | 0.668 ± 0.045 | 0.632 ± 0.044 | 0.720 ± 0.055 | 0.664 ± 0.021 | 0.676 ± 0.021 |
| | Adrenals (mg%) | 14.66 ± 2.63 | 14.58 ± 1.99 | 13.38 ± 1.75 | 15.72 ± 0.93 | 12.10 ± 2.36 | 11.96 ± 2.24 |
| | Testes (g%) | 0.727 ± 0.109 (7) | 0.718 ± 0.071 (12) | 0.754 ± 0.069 (12) | 0.746 ± 0.169 (7) | 0.736 ± 0.077 | 0.750 ± 0.041 |
| | Epididymides (g%) | 0.286 ± 0.046 (7) | 0.274 ± 0.022 (12) | 0.290 ± 0.022 (12) | 0.287 ± 0.054 (7) | 0.284 ± 0.018 | 0.298 ± 0.013 |
| Female | | | | | | | |
| | Number of animals | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Final body weight (g) | 306.8 ± 13.3 (12) ^{a)} | 323.1 ± 25.5 (12) | 312.5 ± 23.9 (12) | 319.8 ± 21.1 (8) | 299.4 ± 20.8 | 299.0 ± 39.4 |
| | Absolute organ weight | | | | | | |
| | Brain (g) | 2.072 ± 0.109 | 1.990 ± 0.065 | 1.942 ± 0.099 | 1.952 ± 0.105 | 1.992 ± 0.041 | 1.970 ± 0.066 |
| | Thymus (mg) | 287.8 ± 108.9 | 205.2 ± 69.5 | 239.6 ± 63.5 | 246.2 ± 72.6 | 340.2 ± 71.5 | 272.2 ± 38.2 |
| | Heart (g) | 1.000 ± 0.083 | 1.022 ± 0.108 | 0.976 ± 0.076 | 0.996 ± 0.062 | 0.976 ± 0.050 | 0.990 ± 0.063 |
| | Liver (g) | 10.546 ± 1.329 | 10.790 ± 0.726 | 10.022 ± 0.877 | 11.366 ± 0.619 | 7.810 ± 0.843 | 7.986 ± 1.318 |
| | Spleen (g) | 0.714 ± 0.074 | 0.704 ± 0.018 | 0.714 ± 0.102 | 0.714 ± 0.119 | 0.566 ± 0.050 | 0.560 ± 0.099 |
| | Kidneys (g) | 2.054 ± 0.145 | 2.026 ± 0.101 | 2.000 ± 0.173 | 2.084 ± 0.176 | 1.944 ± 0.178 | 1.980 ± 0.210 |
| | Adrenals (mg) | 76.98 ± 8.12 | 71.20 ± 3.87 | 72.18 ± 10.22 | 74.38 ± 12.55 | 77.40 ± 6.75 | 74.02 ± 10.55 |
| | Relative organ weight | | | | | | |
| | Brain (g%) | 0.686 ± 0.063 | 0.632 ± 0.067 | 0.664 ± 0.067 | 0.626 ± 0.036 | 0.666 ± 0.054 | 0.672 ± 0.114 |
| | Thymus (mg%) | 95.12 ± 35.19 | 64.56 ± 22.26 | 81.28 ± 20.30 | 78.82 ± 22.68 | 114.46 ± 27.53 | 91.24 ± 8.05 |
| | Heart (g%) | 0.332 ± 0.011 | 0.322 ± 0.013 | 0.336 ± 0.043 | 0.318 ± 0.023 | 0.326 ± 0.018 | 0.334 ± 0.038 |
| | Liver (g%) | 3.478 ± 0.288 | 3.408 ± 0.225 | 3.416 ± 0.283 | 3.642 ± 0.180 | 2.608 ± 0.186 | 2.660 ± 0.128 |
| | Spleen (g%) | 0.234 ± 0.015 | 0.222 ± 0.022 | 0.242 ± 0.024 | 0.230 ± 0.037 | 0.190 ± 0.028 | 0.188 ± 0.016 |
| | Kidneys (g%) | 0.678 ± 0.023 | 0.640 ± 0.041 | 0.682 ± 0.045 | 0.668 ± 0.058 | 0.652 ± 0.079 | 0.664 ± 0.052 |
| | Adrenals (mg%) | 25.48 ± 2.84 | 22.58 ± 2.53 | 24.72 ± 4.32 | 23.86 ± 3.98 | 25.94 ± 2.58 | 25.02 ± 4.18 |

a) Number of animals examined.

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 5 Histopathological findings in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Organ | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | Recovery period | |
|------|---|--------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| | | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 |
| | Finding | Number of animals | 7 | 12 | 12 | 7 | 5 | 5 |
| Male | | (Grade) | | | | | | |
| | Heart | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Degeneration, myocardium, focal | 1+ | 1 | | | 1 | | |
| | Lymph node, mandibular | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Lymph node, mesenteric | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Thymus | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Cyst | 1+ | 1 | | | 0 | | |
| | Spleen | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Bone marrow, femur | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Trachea | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Lung (and bronchus) | | <6> | <4> | <0> | <5> | <1> | <0> |
| | Hemorrhage, focal | 1+ | 0 | 2 | | 1 | 1 | |
| | Metaplasia, osseous | 1+ | 1 | 0 | | 1 | 0 | |
| | Stomach | | <5> | <5> | <5> | <7> | <5> | <5> |
| | Cell infiltration, inflammatory, forestomach, diffuse | 1+ | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Edema, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Erosion, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | Hyperkeratosis, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | Hyperplasia, squamous, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 |
| | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | | 3+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Parakeratosis, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| | Small intestine, duodenum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Small intestine, jejunum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Small intestine, ileum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Large intestine, cecum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Large intestine, colon | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Large intestine, rectum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Liver | | <5> | <0> | <1> | <5> | <0> | <0> |
| | Cell infiltration, inflammatory, focal | 1+ | 3 | | 1 | 2 | | |
| | Kidney | | <5> | <5> | <6> | <5> | <5> | <5> |
| | Basophilic tubule, proximal tubule | 1+ | 5 | 2 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| | Cast, hyaline | 1+ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Cyst | 1+ | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Hyaline droplet, proximal tubule | 1+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | Hyperplasia, pelvic epithelium | 1+ | 0 | 0 | 4* | 3 | 0 | 0 |
| | Mineralization, cortex | 1+ | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | Mineralization, papilla | 1+ | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

| Sex | Organ | Dose level (mg/kg) | Finding | Number of animals | Administration period | | | | Recovery period | |
|------|--|--------------------|---------|-------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|
| | | | | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 |
| | | | | | 7 | 12 | 12 | 7 | 5 | 5 |
| Male | | | | (Grade) | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> |
| | Urinary bladder | | | | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> |
| | Hyperplasia, mucosal epithelium | | | 1+ | 0 | 0 | 5** | 0** | 0 | 5** |
| | | | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| | Testis | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Atrophy, seminiferous tubule, diffuse | | | 2+ | 0 | | | 1 | | |
| | Atrophy, seminiferous tubule, focal | | | 2+ | 1 | | | 0 | | |
| | Epididymis | | | | <5> | <0> | <1> | <5> | <0> | <0> |
| | Cell debris, duct | | | 1+ | 1 | | 0 | 1 | | |
| | Decrease, sperm, duct | | | 1+ | 1 | | 0 | 0 | | |
| | | | | 2+ | 0 | | 0 | 1 | | |
| | Granuloma, spermatic | | | 1+ | 1 | | 1 | 0 | | |
| | Seminal vesicle | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Prostate | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Cell infiltration, lymphocyte, interstitium | | | 1+ | 2 | | | 1 | | |
| | | | | 2+ | 1 | | | 0 | | |
| | Pituitary | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Thyroid | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Ultimobrancheal remnant | | | 1+ | 3 | | | 1 | | |
| | Parathyroid | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Adrenal | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Accessory adrenocortical tissue | | | 1+ | 1 | | | 0 | | |
| | Hypertrophy, cortical cell, glomerular zone, focal | | | 1+ | 1 | | | 0 | | |
| | Brain | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Spinal cord | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Sciatic nerve | | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> |
| | Skin | | | | <0> | <0> | <0> | <0> | <0> | <0> |

<>: Number of animals examined.
 Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade
 Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

| Sex | Organ | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | Recovery period | | Death | Total litter loss |
|--------|---|--------------------|-----------------------|--------|--------|--------|-----------------|--------|--------|-------------------|
| | | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 | 300 | 300 |
| | Finding | Number of animals | 7 | 12 | 12 | 7 | 5 | 5 | 2 | 1 |
| Female | | (Grade) | | | | | | | | |
| | Heart | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Lymph node, mandibular | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Lymph node, mesenteric | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Thymus | | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <2> | <1> |
| | Atrophy | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | Hemorrhage | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | Spleen | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Extramedullary hematopoiesis | 1+ | 4 | | | 5 | | | 0 | 0 |
| | Atrophy, white pulp | 1+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Bone marrow, femur | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Trachea | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Cell infiltration, inflammatory, lamina propria | 2+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Necrosis, mucosal epithelium | 3+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Lung (and bronchus) | | <6> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Cell infiltration, inflammatory, focal | 1+ | 1 | | | 0 | | | 0 | 0 |
| | Hemorrhage, focal | 1+ | 1 | | | 0 | | | 0 | 0 |
| | Congestion | 2+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Edema | 1+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Thrombus | 1+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Stomach | | <5> | <5> | <5> | <8> | <5> | <5> | <2> | <1> |
| | Cell infiltration, inflammatory, forestomach, diffuse | 1+ 2+ | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 6 1 | ** 0 | 0 0 | 0 0 | 0 1 |
| | Edema, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 5* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Erosion, forestomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | Hyperkeratosis, forestomach | 1+ 2+ | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 7 0 | ** 0 | 0 0 | 0 2 | 0 1 |
| | Hyperplasia, squamous, forestomach | 1+ 2+ | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 1 6 | ** 0 | 0 0 | 2 0 | 1 0 |
| | Mineralization, glandular stomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Parakeratosis, forestomach | 1+ 2+ | 0 0 | 0 0 | 0 0 | 2 0 | 0 0 | 0 0 | 1 0 | 0 1 |
| | Atrophy, mucosa, glandular stomach | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Small intestine, duodenum | | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <2> | <1> |
| | Hyperplasia, mucosal epithelium | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Small intestine, jejunum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <0> | <1> |
| | Small intestine, ileum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <0> | <1> |
| | Large intestine, cecum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <1> | <1> |
| | Large intestine, colon | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Large intestine, rectum | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

| Sex | Organ | Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | Recovery period | | Death | Total litter loss |
|-----------------|---|--------------------|-----------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------------------|
| | | | 0 | 10 | 60 | 300 | 0 | 300 | 300 | 300 |
| | Finding | Number of animals | 7 | 12 | 12 | 7 | 5 | 5 | 2 | 1 |
| Female | | (Grade) | <5> | <1> | <0> | <5> | <1> | <0> | <2> | <1> |
| Liver | | | <5> | <1> | <0> | <5> | <1> | <0> | <2> | <1> |
| | Cell infiltration, inflammatory, focal | 1+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Hemorrhage, focal | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Thrombus, central vein | 2+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | Vacuolation, hepatocyte, diffuse | 2+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Kidney | | | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <1> | <5> |
| | Basophilic tubule, proximal tubule | 1+ | 0 | 2 | 1 | 3 [*] | 2 | 2 | 0 | 1 |
| | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Degeneration/necrosis, tubular epithelium | 1+ | 0 | 0 | 4 [*] | 4 [*] | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Hyperplasia, pelvic epithelium | 1+ | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | Mineralization, papilla | 1+ | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | Vacuolation, proximal tubule | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Urinary bladder | | | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <5> | <1> | <1> |
| | Hyperplasia, mucosal epithelium | 1+ | 0 | 0 | 5 ^{**} | 0 ^{**} | 0 | 5 ^{**} | 1 | 1 |
| | | 2+ | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ovary | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| Uterus | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Hemorrhage | 1+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| Vagina | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| Pituitary | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Cystic dilatation, Rathke's pouch | 1+ | 0 | | | 1 | | | 0 | 0 |
| Thyroid | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <0> | <1> |
| | Ectopic thymic tissue | 1+ | 1 | | | 0 | | | | 0 |
| | Ultimobrancheal remnant | 1+ | 3 | | | 1 | | | | 1 |
| Parathyroid | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| Adrenal | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| | Necrosis, focal | 1+ | 0 | | | 0 | | | 1 | 0 |
| | Hypertrophy, fascicular zone | 1+ | 0 | | | 0 | | | 0 | 1 |
| Brain | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| Spinal cord | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| Sciatic nerve | | | <5> | <0> | <0> | <5> | <0> | <0> | <2> | <1> |
| Skin | | | <0> | <1> | <0> | <0> | <0> | <0> | <0> | <0> |
| | Atrophy, hair follicle | 1+ | | 1 | | | | | | |

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose level (mg/kg) | Administration period | | | |
|---|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 | 10 | 60 | 300 |
| Number of pairs examined | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Estrous cycle | 4.00 ± 0.00 | 4.08 ± 0.29 | 4.00 ± 0.00 | 4.05 ± 0.15 |
| Irregular estrous cycle | 0/12 | 0/12 | 0/12 | 1/12 |
| Number of pairs with successful mating | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Mating index (%) ^{a)} | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Number of pregnant females | 12 | 12 | 12 | 11 |
| Fertility index (%) ^{b)} | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 91.7 |
| Pairing days until mating | 2.4 ± 1.1 | 2.3 ± 1.1 | 2.9 ± 1.2 | 3.1 ± 1.0 |
| Number of estrous stages without mating | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose level (mg/kg) | Administration period | | | | | |
|--|-----------------------|---------------|---------------|---------------|------------|------------|
| | 0 | 10 | 60 | 300 | | |
| Number of females examined | 12 | 12 | 12 | 11 | | |
| Number of females with live pups | 12 | 12 | 12 | 9 | | |
| Gestation index (%) ^{a)} | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 81.8 | | |
| Gestation length (days) | 22.4 ± 0.5 | 22.8 ± 0.5 | 22.6 ± 0.5 | 23.1 ± 0.3** | | |
| Number of corpora lutea | 16.8 ± 1.9 | 15.8 ± 1.6 | 14.4 ± 2.9 | 15.7 ± 1.1 | | |
| Number of implantation sites | 16.3 ± 2.0 | 15.6 ± 1.6 | 14.1 ± 3.0 | 15.3 ± 1.2 | | |
| Implantation index (%) ^{b)} | 96.51 ± 4.21 | 98.46 ± 2.80 | 97.40 ± 4.95 | 97.15 ± 4.43 | | |
| Delivery index (%) ^{c)} | 94.88 ± 4.83 | 84.43 ± 17.73 | 89.79 ± 12.20 | 86.40 ± 7.86 | | |
| Number of pups delivered | 15.4 ± 2.0 | 13.3 ± 3.3 | 12.8 ± 3.6 | 13.1 ± 1.3* | | |
| Number of live pups on day 0 | 15.0 ± 2.1 | 13.3 ± 3.3 | 12.8 ± 3.6 | 10.8 ± 4.6 | | |
| Live birth index (%) ^{d)} | 97.22 ± 5.56 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 83.01 ± 34.61 | | |
| Sex ratio (male/female) | 0.89(87/98) | 0.89(75/84) | 0.83(70/84) | 0.95(55/58) | | |
| Number of live pups on day 4 | 14.9 ± 2.1 | 13.3 ± 3.3 | 12.8 ± 3.6 | 12.0 ± 2.7 | | |
| Viability index on day 4 (%) ^{e)} | 99.51 ± 1.70 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 98.21 ± 5.06 | | |
| Body weight of pups (g) | on day 0 | male | 6.5 ± 0.6 | 7.0 ± 1.1 | 6.9 ± 0.8 | 7.4 ± 0.4 |
| | | female | 6.0 ± 0.5 | 6.6 ± 1.1 | 6.5 ± 0.7 | 6.8 ± 0.7 |
| | on day 4 | male | 10.4 ± 0.9 | 11.6 ± 2.0 | 11.4 ± 1.8 | 11.9 ± 1.0 |
| | | female | 9.8 ± 0.8 | 11.1 ± 2.0 | 10.8 ± 1.7 | 11.1 ± 1.1 |
| Body weight gain of pups (g) | day 0 to 4 | male | 3.9 ± 0.5 | 4.5 ± 1.0 | 4.5 ± 1.1 | 4.5 ± 0.9 |
| | | female | 3.7 ± 0.5 | 4.5 ± 1.0 | 4.3 ± 1.2 | 4.3 ± 0.8 |

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Hydroxyethyl methacrylate on Bacteria

要約

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)} の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験を 313~5000 μg /プレート の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル(CAS No. 868-77-9)は、分子量 130.16 の無色透明液体である。用いた被験物質は、(株)日本触媒製造、ロット番号 5P05LA、純度 97.6 wt% [不純物:0.2-0.3% エチレングリコールジ

メタクリレート、2.0-2.5% ジエチレングリコールモノメタクリレート、50 ppm メトキノン(重合防止剤)] であり、(株)日本触媒から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に(株)日本触媒において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.3 wt% であった。メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、局方注射用水(ロット番号:K5A80、(株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix の組成〕

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

| | |
|-------------------|--------|
| (A) バクトアガー(Difco) | 0.6% |
| 塩化ナトリウム | 0.5% |
| (B)* L-ヒスチジン | 0.5 mM |
| D-ビオチン | 0.5 mM |

*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

| | |
|---------------|--------|
| 硫酸マグネシウム・7水和物 | 0.2 g |
| クエン酸・1水和物 | 2 g |
| リン酸水素二カリウム | 10 g |
| リン酸一アンモニウム | 1.92 g |
| 水酸化ナトリウム | 0.66 g |
| グルコース | 20 g |
| バクトアガー(Difco) | 15 g |

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

| | |
|----------------------|----------|
| S9** | 0.1 ml |
| 塩化マグネシウム | 8 μmol |
| 塩化カリウム | 33 μmol |
| グルコース-6-リン酸 | 5 μmol |
| NADH | 4 μmol |
| NADPH | 4 μmol |
| ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) | 100 μmol |

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB) および 5, 6-ベンゾフラボン(BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法⁴⁾により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合し, 37℃で20分間往復振とう培養したのち, トップアガー 2 ml を加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37℃で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ, 各用量については 1 枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち, 1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルについて 50~5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 として, 用量設定試験を実施した。その結果, すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μg/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに 313~5000 μg/プレート の範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (I) on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--|--|-----|------|--------|-----|-----|-----------------|-----|-----|------|-----|-----|--------|------|------|-------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | | Base-pair substitution type | | | | | | Frameshift type | | | | | | | | | | | | | |
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | | | | | | |
| S9 mix (-) | 0 | 154 | 171 | 159 | 13 | 7 | 12 | 28 | 26 | 29 | 25 | 33 | 27 | 11 | 15 | 10 | (161 \pm 8.7) | (11 \pm 3.2) | (28 \pm 1.5) | (28 \pm 4.2) | (12 \pm 2.6) |
| | 313 | 141 | 158 | 160 | 13 | 9 | 10 | 31 | 33 | 30 | 23 | 28 | 19 | 11 | 8 | 10 | (153 \pm 10.4) | (11 \pm 2.1) | (31 \pm 1.5) | (23 \pm 4.5) | (10 \pm 1.5) |
| | 625 | 141 | 147 | 139 | 12 | 14 | 12 | 30 | 34 | 31 | 27 | 20 | 20 | 9 | 12 | 8 | (142 \pm 4.2) | (13 \pm 1.2) | (32 \pm 2.1) | (22 \pm 4.0) | (10 \pm 2.1) |
| | 1250 | 151 | 133 | 149 | 9 | 17 | 9 | 31 | 37 | 22 | 12 | 19 | 18 | 14 | 8 | 9 | (144 \pm 9.9) | (12 \pm 4.6) | (30 \pm 7.5) | (16 \pm 3.8) | (10 \pm 3.2) |
| | 2500 | 137 | 137 | 157 | 12 | 15 | 13 | 30 | 26 | 20 | 28 | 20 | 18 | 12 | 9 | 12 | (144 \pm 11.5) | (13 \pm 1.5) | (25 \pm 5.0) | (22 \pm 5.3) | (11 \pm 1.7) |
| | 5000 | 154 | 141 | 160 | 12 | 10 | 19 | 29 | 26 | 23 | 25 | 33 | 23 | 15 | 12 | 15 | (152 \pm 9.7) | (14 \pm 4.7) | (26 \pm 3.0) | (27 \pm 5.3) | (14 \pm 1.7) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 mix (+) | 0 | 156 | 193 | 150 | 11 | 10 | 9 | 40 | 39 | 40 | 44 | 26 | 36 | 11 | 20 | 9 | (166 \pm 23.3) | (10 \pm 1.0) | (40 \pm 0.6) | (35 \pm 9.0) | (13 \pm 5.9) |
| | 313 | 129 | 162 | 154 | 11 | 15 | 13 | 27 | 27 | 35 | 20 | 29 | 33 | 15 | 13 | 8 | (148 \pm 17.2) | (13 \pm 2.0) | (30 \pm 4.6) | (27 \pm 6.7) | (12 \pm 3.6) |
| | 625 | 157 | 183 | 181 | 14 | 13 | 8 | 48 | 36 | 31 | 25 | 35 | 37 | 12 | 15 | 7 | (174 \pm 14.5) | (12 \pm 3.2) | (38 \pm 8.7) | (32 \pm 6.4) | (11 \pm 4.0) |
| | 1250 | 177 | 180 | 182 | 14 | 9 | 11 | 36 | 28 | 41 | 34 | 30 | 27 | 8 | 11 | 10 | (180 \pm 2.5) | (11 \pm 2.5) | (35 \pm 6.6) | (30 \pm 3.5) | (10 \pm 1.5) |
| | 2500 | 172 | 177 | 172 | 13 | 10 | 12 | 33 | 40 | 29 | 22 | 30 | 36 | 6 | 10 | 8 | (174 \pm 2.9) | (12 \pm 1.5) | (34 \pm 5.6) | (29 \pm 7.0) | (8 \pm 2.0) |
| | 5000 | 162 | 175 | 160 | 15 | 11 | 15 | 37 | 30 | 33 | 30 | 30 | 34 | 9 | 11 | 12 | (166 \pm 8.1) | (14 \pm 2.3) | (33 \pm 3.5) | (31 \pm 2.3) | (11 \pm 1.5) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Positive control | Chemical | AF2 | | | SA | | | AF2 | | | AF2 | | | 9AA | | | | | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | | | 0.5 | | | 0.01 | | | 0.1 | | | 80 | | | | | | | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | 689 | 685 | 779 | 262 | 272 | 295 | 337 | 289 | 301 | 688 | 663 | 721 | 1291 | 1123 | 1369 | (718 \pm 53.2) | (276 \pm 16.9) | (309 \pm 25.0) | (691 \pm 29.1) | (1261 \pm 125.7) |
| Positive control | Chemical | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | | | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | | | 2 | | | 10 | | | 0.5 | | | 2 | | | | | | | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | 755 | 927 | 1012 | 300 | 298 | 262 | 582 | 746 | 652 | 298 | 332 | 304 | 367 | 346 | 313 | (898 \pm 130.9) | (287 \pm 21.4) | (660 \pm 82.3) | (311 \pm 18.1) | (342 \pm 27.2) |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (II) on bacteria

| With(+)or without(-) S9 mix | Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--|--|-----|-----------------|------------------|-----|-----------------|------------------|-----|-----------------|------------------|-----|-----------------|--------------------|------|------|--|
| | | Base-pair substitution type | | | | | | Frameshift type | | | | | | | | | |
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | | |
| S9 mix (-) | 0 | 140 | 125 | 147 | 11 | 18 | 13 | 25 | 27 | 23 | 20 | 31 | 20 | 12 | 14 | 11 | |
| | | (137 \pm 11.2) | | | (14 \pm 3.6) | | | (25 \pm 2.0) | | | (24 \pm 6.4) | | | (12 \pm 1.5) | | | |
| | 313 | 124 | 122 | 145 | 13 | 10 | 19 | 26 | 22 | 28 | 31 | 19 | 33 | 4 | 8 | 9 | |
| | | (130 \pm 12.7) | | | (14 \pm 4.6) | | | (25 \pm 3.1) | | | (28 \pm 7.6) | | | (7 \pm 2.6) | | | |
| | 625 | 116 | 104 | 169 | 8 | 8 | 10 | 26 | 26 | 25 | 26 | 26 | 19 | 14 | 6 | 6 | |
| | | (130 \pm 34.6) | | | (9 \pm 1.2) | | | (26 \pm 0.6) | | | (24 \pm 4.0) | | | (9 \pm 4.6) | | | |
| | 1250 | 108 | 118 | 116 | 14 | 10 | 13 | 23 | 20 | 26 | 30 | 22 | 14 | 7 | 5 | 11 | |
| | | (114 \pm 5.3) | | | (12 \pm 2.1) | | | (23 \pm 3.0) | | | (22 \pm 8.0) | | | (8 \pm 3.1) | | | |
| 2500 | 151 | 141 | 139 | 19 | 10 | 8 | 17 | 20 | 26 | 22 | 15 | 25 | 5 | 7 | 12 | | |
| | (144 \pm 6.4) | | | (12 \pm 5.9) | | | (21 \pm 4.6) | | | (21 \pm 5.1) | | | (8 \pm 3.6) | | | | |
| 5000 | 149 | 134 | 151 | 10 | 9 | 10 | 20 | 27 | 31 | 20 | 27 | 30 | 8 | 12 | 9 | | |
| | (145 \pm 9.3) | | | (10 \pm 0.6) | | | (26 \pm 5.6) | | | (26 \pm 5.1) | | | (10 \pm 2.1) | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 mix (+) | 0 | 141 | 115 | 140 | 9 | 14 | 11 | 37 | 26 | 28 | 34 | 22 | 31 | 9 | 5 | 8 | |
| | | (132 \pm 14.7) | | | (11 \pm 2.5) | | | (30 \pm 5.9) | | | (29 \pm 6.2) | | | (7 \pm 2.1) | | | |
| | 313 | 141 | 138 | 137 | 6 | 11 | 7 | 37 | 23 | 29 | 38 | 30 | 21 | 6 | 8 | 6 | |
| | | (139 \pm 2.1) | | | (8 \pm 2.6) | | | (30 \pm 7.0) | | | (30 \pm 8.5) | | | (7 \pm 1.2) | | | |
| | 625 | 128 | 147 | 131 | 10 | 18 | 17 | 22 | 30 | 29 | 26 | 27 | 28 | 12 | 3 | 5 | |
| | | (135 \pm 10.2) | | | (15 \pm 4.4) | | | (27 \pm 4.4) | | | (27 \pm 1.0) | | | (7 \pm 4.7) | | | |
| | 1250 | 140 | 170 | 143 | 10 | 20 | 13 | 35 | 31 | 21 | 24 | 24 | 21 | 5 | 8 | 15 | |
| | | (151 \pm 16.5) | | | (14 \pm 5.1) | | | (29 \pm 7.2) | | | (23 \pm 1.7) | | | (9 \pm 5.1) | | | |
| 2500 | 159 | 151 | 146 | 10 | 12 | 17 | 30 | 35 | 29 | 24 | 28 | 29 | 12 | 10 | 8 | | |
| | (152 \pm 6.6) | | | (13 \pm 3.6) | | | (31 \pm 3.2) | | | (27 \pm 2.6) | | | (10 \pm 2.0) | | | | |
| 5000 | 146 | 173 | 170 | 5 | 10 | 15 | 26 | 38 | 33 | 28 | 27 | 32 | 8 | 8 | 8 | | |
| | (163 \pm 14.8) | | | (10 \pm 5.0) | | | (32 \pm 6.0) | | | (29 \pm 2.6) | | | (8 \pm 0.0) | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Positive control | Chemical | AF2 | | | SA | | | AF2 | | | AF2 | | | 9AA | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | | | 0.5 | | | 0.01 | | | 0.1 | | | 80 | | | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | 644 | 728 | 760 | 347 | 386 | 359 | 483 | 487 | 475 | 672 | 665 | 608 | 1320 | 1043 | 1130 | |
| | | (711 \pm 59.9) | | | (364 \pm 20.0) | | | (482 \pm 6.1) | | | (648 \pm 35.1) | | | (1164 \pm 141.7) | | | |
| Positive control | Chemical | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | | | 2 | | | 10 | | | 0.5 | | | 2 | | | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | 658 | 680 | 770 | 310 | 335 | 315 | 473 | 407 | 420 | 281 | 255 | 313 | 269 | 274 | 260 | |
| | | (703 \pm 59.3) | | | (320 \pm 13.2) | | | (433 \pm 35.0) | | | (283 \pm 29.1) | | | (268 \pm 7.1) | | | |

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and
50 ppm methoquinone were contained as impurities.

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of
2-Hydroxyethyl methacrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)ともに1.3 mg/ml(10 mM)においても50%を超える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において1.3 mg/mlの濃度を最高処理濃度として、連続処理および短時間処理のS9 mix存在下では、公比2で4濃度、短時間処理のS9 mix非存在下では、公比2で3濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理と短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下では1.3 mg/ml(10 mM)、48時間連続処理では0.65 mg/mlであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した高濃度群(1.3 mg/ml)では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群(0.65 mg/ml)および高濃度群(1.3 mg/ml)において染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は10.0%および70.6%であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は6.0~84.0%であった。また、高濃度群(0.65 mg/ml)において、観察した細胞の3.25%に倍数性細胞が認められた。短時間処理では、S9 mix非存在下において、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群(0.33 mg/ml)および高濃度群(1.3 mg/ml)において観察した細胞の0.88%および6.13%に倍数性細胞が誘発された。S9 mix存在下では、高濃度群(1.3 mg/ml)において観察した細胞の13.0%に染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された。また、中濃度群(0.65 mg/ml)において観察した細胞の1.25%に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Cansera International)を10%添加したイーグル MEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステル(略号: HEMA, CAS No.: 868-77-9, ロット番号: 5P05LA, (株)日本触媒)は、無色透明液体で、水に対しては54.5 mg/ml, DMSOでは50 mg/ml, アセトンでは50 mg/mlで溶解し、融点-10°C以下、沸点87°C(5 mmHg)で、分子式C₆H₁₀O₃, 分子量130.16, 純度97.6 wt%(不純物としてエチレングリコールジメタクリレート0.2-0.3%, ジエチレングリコールモノメタクリレート2.0-2.5%, メトキノン(重合防止剤)50 ppmを含む)の物質である。

被験物質原体は、熱、光、過酸化物などによって重合が起こることがある。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液

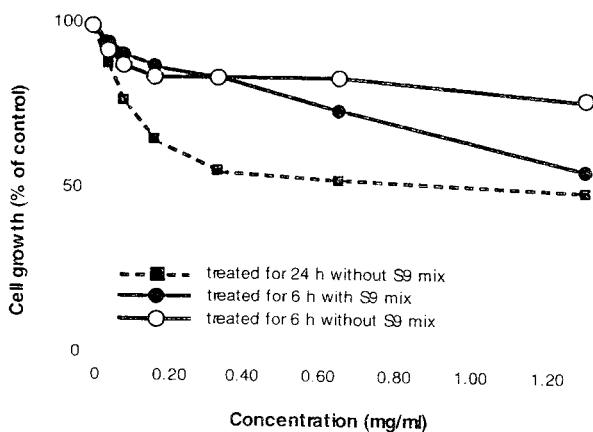


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxyethyl methacrylate

は、すべての試験において培養液の 10%(v/v) になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (Monocellater™, オリパス光学工業(株)) を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で 50% を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに 1.3 mg/ml (10 mM) とし、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比 2 で 4 濃度を設定 (0.16, 0.33, 0.65, 1.3 mg/ml) し、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比 2 で 3 濃度設定した (0.33, 0.65, 1.3 mg/ml)。なお、連続処理の 48 時間処理群の濃度は、24 時間処理群と同じ濃度に設定した。陽性対照物質として用いたマイトマイシン C (MC, 協和醗酵工業(株)) およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.) は、注射用水 (株) 大塚製薬工場) に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては 1 濃度あたり 4 枚ディッシュを用い、そのうちの 2 枚は染色体標本作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/ml になるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッ

シユにつき 6 枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20% 以上の相対増殖率で、かつ 2 ディッシュともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の 3 濃度群を決定した。その結果 (Table 1, 2), 24 時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml (10 mM) が、48 時間連続処理においては 0.65 mg/ml が染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む 3 濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1 つのディッシュから得られた異なるスライドを、4 名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (MMS) 研究会²⁾ による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞 (polyploid) の有無について観察した。また構造異常については 1 群 200 個、倍数性細胞については 1 群 800 個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法²⁾ (多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした) により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.05$) を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて 24 時間連続処理した高濃度群 (1.3 mg/ml) では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群 (0.65 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48 時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 6.0 ~ 84.0% であった。また、高濃度群 (0.65 mg/ml) において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められ、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群 (0.33 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発され、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

S9 mix 存在下では、高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発された。また、中濃度群 (0.65 mg/ml) において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

従って、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 水谷正寛,
澁谷 徹, 橋本恵子, 出石由紀
(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya,
Keiko Hashimoto, Yuki Izushi
Hatano Research Institute, Food and Drug
Safety Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)** without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells | | | Trend test ⁵⁾ | | Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%) | |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------|----|---|-------|
| | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | with aberrations TAG (%) | Polyploid ⁴⁾ TA (%) | Polyploid ⁴⁾ (%) | SA | NA | | |
| Control | | | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.50 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.75 | | | 100.0 |
| HEMA | 0.33 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | | | 70.0 |
| HEMA | 0.65 | 24 | 200 | 14 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 20*(10.0) | 8 (4.0) | 0.63 | + | NT | 64.5 | |
| HEMA | 1.3 | 24 | 177 | 40 | 228 | 34 | 1 | 0 | 110 | 413 | 2 | 125*(70.6) | 112 (63.3) | 0.28 ⁷⁾ | | | 46.5 | |
| MC | 0.00005 | 24 | 200 | 8 | 70 | 145 | 2 | 1 | 0 | 226 | 0 | 113 (56.5) | 112 (56.0) | 0.38 | | | - | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.50 | | | 100.0 | |
| HEMA | 0.16 | 48 | 200 | 6 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | 12 | 0 | 12*(6.0) | 6 (3.0) | 0.50 | | | 59.5 | |
| HEMA | 0.33 | 48 | 200 | 15 | 5 | 1 | 2 | 0 | 0 | 23 | 0 | 20*(10.0) | 7 (3.5) | 0.63 | + | + | 69.5 | |
| HEMA | 0.65 | 48 | 200 | 102 | 329 | 51 | 6 | 1 | 120 | 609 | 1 | 168*(84.0) | 153 (76.5) | 3.25* | | | 79.0 | |
| HEMA | 1.3*** | 48 | - | | | | | | | | | | | | | | 0.0 | |
| MC | 0.00005 | 48 | 200 | 5 | 51 | 118 | 10 | 4 | 30 | 218 | 0 | 93 (46.5) | 92 (46.0) | 1.38 | | | - | |

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. 7)Seven hundred and two cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control data (p<0.05) by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)** with and without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | S9 mix | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | Others ³⁾ | No. of cells | | | Trend test ⁵⁾ | | Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%) |
|-----------------------|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------|----|---|
| | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | | with aberrations TAG (%) | Polyploid ⁴⁾ TA (%) | Polyploid ⁴⁾ (%) | SA | NA | |
| Control | | | | 200 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0.38 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.50 | | | 100.0 |
| HEMA | 0.33 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.88* | | | 84.0 |
| HEMA | 0.65 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.50 | NT | + | 83.5 |
| HEMA | 1.3 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 (1.5) | 2 (1.0) | 6.13* | | | 86.5 |
| CPA | 0.005 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.50 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.50 | | | 100.0 |
| HEMA | 0.33 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 5 | 0 | 4 (2.0) | 4 (2.0) | 0.88 | | | 80.0 |
| HEMA | 0.65 | + | 6-(18) | 200 | 1 | 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 6 (3.0) | 5 (2.5) | 1.25* | + | - | 70.0 |
| HEMA | 1.3 | + | 6-(18) | 200 | 4 | 11 | 16 | 0 | 0 | 0 | 31 | 0 | 26*(13.0) | 22 (11.0) | 0.88 | | | 58.0 |
| CPA | 0.005 | + | 6-(18) | 200 | 13 | 43 | 90 | 1 | 1 | 0 | 148 | 0 | 83 (41.5) | 77 (38.5) | 0.50 | | | - |

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. *:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities.

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの
ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of
2-Hydroxyethyl methacrylate by Oral Administration in Rats

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下 300, 100 および 30 mg/kgとした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

1. 反復投与毒性

雄においては、一般状態では 1000 mg/kg群で流涎がみられ、1/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg群で増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg群で減少がみられた。血液学検査では、各投与群とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。血液生化学検査では、30 mg/kg以上の群で尿素窒素の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg群でK、Clおよび無機リンの高値およびトリグリセライドの低値がみられた。剖検では、各投与群とも、投与による影響はみられなかった。死亡例では、胸腺および肺の暗赤色化、副腎の肥大がみられた。器官重量では、100 mg/kg以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg群で腎臓に尿細管拡張および集合管拡張がみられた。しかし、死亡例においては投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

雌においては、一般状態では 1000 mg/kg群で流涎、自発運動の低下、腹臥、流涙、被毛の汚れ、表皮温下降および呼吸緩徐がみられ、6/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg群で交配前投与期間に増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg群で交配前投与期間に減少がみられた。剖検所見では、1000 mg/kg群で胸腺の萎縮および副腎の肥大がみられた。死亡例では、胸腺の萎縮、肺の暗赤色化、脾臓の萎縮、副腎の肥大、腺胃粘膜の暗赤色化および小腸の暗赤色化がみられた。器官重量では、100 mg/kg以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg群で腎臓の絶対・相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg群で腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤、脳に延髄の広範な軟化がみられた。死亡例においては、脾臓の萎縮、副腎の束状帯の過形成など死戦期のストレスに起因すると思われる変化がみられた。

2. 生殖発生毒性

発情回数、交尾率、交尾日数、受胎雌数、妊娠期間および受胎率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。また、分娩状態にも異常はみられなかった。黄体数、着床痕数、着床率および出産率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

総出産児数、分娩率、哺育0日の新生児数、児の産出率、死産児数、出生率、性比、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。外表観察では、いずれの群においても異常はみられなかった。体重では、各投与群の雌雄とも哺育0日および哺育4日ともに対照群との間に差はみられなかった。一般状態では、対照群および各投与群とも異常症状はみられなかった。また、剖検では、いずれの群においても異常はみられなかった。

以上のことから、当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は、雄では 30 mg/kg投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day未満、雌では 100 mg/kg投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/dayと推察される。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体

被験物質のメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、分子量:130.16、融点:-10℃以下、沸点:87℃の無色透明の液体であり、水およびアセトンにきわめて溶けやすい(Lot No. 5P05LA、製造元:(株)日本触媒、純度:97.6%、ただし、不純物としてエチレングリコールジメタクリレートを 0.2~0.3%、ジエチレングリコールモノメタクリレートを 2.0~2.5%含有)。入手後は、冷蔵・遮光・気密条件下で保管した。なお、投与期間終了後に被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、使用期間中の安定性が確認された。

被験物質は、注射用水に溶解して調製した。なお、2, 20 および 200 mg/mlの調製液は、調製後冷蔵・遮光条件下で7日間、さらに室温・遮光条件下で4時間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、冷蔵・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。被験物質は純度による換算を

行って調製した。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Crj:CD(SD), (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

動物は、室温20~24℃、湿度40~70%、明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は、妊娠18日にオートクレーブ処理した床敷(サンフレーク、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージに個別に移し、自然分娩および哺育をさせた。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。なお、剖検前日の午後4時から絶食とした。

3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

投与経路は経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0、7、14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与回数は1日1回とした。投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が341~380 g、雌が232~256 gであった。

投与量は、先に実施した雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験(投与段階:0, 30, 100, 300 および1000 mg/kg、各群5例)の結果により決定した。すなわち、1000 mg/kg群で投与直後に流涎がみられたのみで、各群とも死亡発現はなく、体重推移および剖検でも異常は認められなかった。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で300, 100 および30 mg/kgとした。また、対照として被験物質と同一容量の媒体(注射用水)を投与する群を設けた。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。なお、死亡例は、発見後速やかに剖検し、異

常の認められた器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、H-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後から毎週2回測定した。

(4) 血液学検査

投与期間終了の翌日に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000、東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数(RET)は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後、Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を計数した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドグラスに塗抹し、May-Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン濃度は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII、三共(株))を用いて測定した。

(5) 血液生化学検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液を遠心分離し、得られた血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、ALPはp-NPP基質法、γ-GTPはγ-G-P-NA基質法、総蛋白はBiuret法、総ビリルビンはAzobilirubin法、尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法、クレアチニンはJaffé法、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、総コレステロールはCOD-DAOS法、トリグリセライドはGPO-DAOS法、Caはo-CPC法、無機リンはMolybdenum blue法により、自動分析装置(AU 500、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04、株A&T)を用いて測定した。

蛋白分画は、電気泳動法により自動電気泳動装置(AES 600、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G比は蛋白分画値から算出した。

(6) 剖検

上記の(4)および(5)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。胸

腺, 肝臓, 腎臓, 精巣および精巣上体は摘出後に重量を測定し, 副腎, 脳, 心臓および脾臓とともに 10% 中性緩衝ホルマリン液(ただし, 精巣および精巣上体はブアン液)に固定した。

(7) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および 1000 mg/kg 群の心臓, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 精巣, 精巣上体, 副腎および脳について H-E 染色組織標本を作製し, 病理組織学的に検査した。1000 mg/kg 群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた腎臓は 30, 100 および 300 mg/kg 群についても同様に検査した。

2) 雌

(1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無は, 投与前・後の 1 日 2 回観察した。なお, 死亡例は, 発見後速やかに剖検し, 卵巣, 子宮および異常の認められた器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定後, H-E 染色組織標本を作製し, 病理組織学的に検査した。

(2) 性周期

性周期は, 投与開始日から交尾確認日まで毎日 1 回観察した。なお, 発情期が連続 2 日間にわたって観察された場合は 1 回と計数した。

(3) 体重測定

体重は, 交配開始前 14 日間および交配期間中には毎週 2 回, 妊娠期間中には妊娠 0, 7, 14 および 21 日に, 哺育期間には哺育 0 および 4 日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は, 交配開始前 14 日間までは毎週 2 回測定した。また, 妊娠期間中は妊娠 2, 9, 16 および 21 日に, 哺育期間中は哺育 4 日に測定した。

(5) 交尾不成立雌の剖検

交尾不成立雌は, 交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し, 着床の有無により妊娠の成否を確認した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ, 分娩状態の異常の有無, 分娩終了の確認を妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前 10 時まで毎日行った。午前 10 時に分娩が終了していた場合, その日を哺育 0 日とした。

(7) 妊娠 25 日までに分娩しなかった雌の剖検

妊娠 25 日までに分娩しなかった雌は, エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し, 着床の有無により妊娠の成否を確認した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は, 哺育状態を哺育 4 日まで毎日観察し, 哺育 4 日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し, 着床痕数および黄体数を数えた。肝臓, 腎臓, 胸腺および卵巣は摘出後に重量を測定し, 副腎, 脳, 心臓および脾臓とともに 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定した。

(9) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および 1000 mg/kg 群の心臓, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 卵巣, 副腎および脳について H-E 染色組織標本を作製し, 病理組織学的に検査した。1000 mg/kg 群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた脳ならびに 1000 mg/kg 群の死亡例で変化のみられた副腎は 30, 100 および 300 mg/kg 群についても同様に検査した。

3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14 日間にわたって投与された雌雄は, 同一群内で 1 対 1 に組み合わせて同居交配した。交配期間は 14 日を限度として, 交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い, 膣垢内に精子または膣栓を確認した雌を交尾成立動物として, その日を妊娠 0 日として起算した。

4) 新生児

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性, 死産児数, 新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 新生児の観察

新生児は, 一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日 1 回観察した。

(3) 体重測定

体重は, 哺育 0 日(出生日)および 4 日に測定した。

(4) 剖検

新生児は, 哺育 4 日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

測定値の統計解析は下記の検定法を用い, 有意差検定は対照群と各投与群との間で行った。いずれの検定においても, 危険率 5% 未満を有意とした。新生児は一腹の平均を一単位として検定した。

体重(親動物, 新生児), 摂餌量, 発情回数, 交尾日数, 妊娠期間 [分娩日(哺育 0 日)-交尾確認日], 着床痕数, 総出産児数(新生児数+死産児数), 新生児数, 死産児数, 分娩率 [(総出産児数/着床痕数)×100], 児の産出率 [(哺育 0 日の新生児数/着床痕数)×100], 黄体数, 着床率 [(着床痕数/黄体数)×100], 出生率 [(哺育 0 日の新生児数/総出産児数)×100], 哺育 4 日の新生児数, 哺育 4 日の生存率 [(哺育 4 日の新生児数/哺育 0 日の新生児数)×100], 外表異常出現率 [(外表異常児数/新生児数)×100], 性比(雄/雌), 器官重量(相対重量を含む), 血液学検査成績, 血液生化学検査成績については, 各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は, Bartlett 法による等分散性の検定を行い, 等分散ならば一元配置法による分散分析²⁾を行い, 有意ならば Dunnett 法²⁾を用いて行った。一方, 等分散と認められなかった場合は, 順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallis の検定³⁾)を行い, 有意ならば順

位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。

交尾率 [(交尾成立動物数/同居動物数)×100]、受胎率 [(受胎雌数/交尾成立動物数)×100]、出産率 [(新生児出産雌数/受胎雌数)×100] は、 χ^2 検定を用いた。

なお、病理組織学検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した器官・組織の所見については、上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。そこで有意差が認められた所見については、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を実施した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与20日に1例が死亡したが、前日まで流涎の他には異常はみられなかった。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられた。

(2) 体重推移 (Fig.1)

30、100 および 300 mg/kg群の体重は、対照群とはほぼ同様の推移であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与18～25 および 32～50日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量 (Fig.2)

30 および 300 mg/kg群の摂餌量は、対照群とはほぼ同程度であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与31日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与13、31、38～45日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 血液学検査 (Table 1)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差はみられなかった。

(5) 血液生化学検査 (Table 2)

30 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素の有意な高値がみられた。100 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが尿素窒素の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素、K、Clおよび無機リンの有意な高値、トリグリセライドの有意な低値がみられた。

(6) 剖検

生存例の剖検において、対照群では片側性の精巣上体の尾部に黄白色結節が1例にみられた。30 および 100 mg/kg群では、いずれにも異常はみられなかった。300 mg/kg群では、片側性の腎臓に白色斑が1例、両側性の

精巣の萎縮と軟化が1例にみられた。1000 mg/kg群では、胸腺の暗赤色化が1例、両側性の腎臓の肥大が1例にみられた。しかし、これらの変化は、いずれも少数例であり、投与によるものではないと判断した。

1000 mg/kg投与群の死亡例の剖検において、肺・胸腺の暗赤色化および両側性の副腎の肥大がみられた。

(7) 器官重量 (Table 3)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

1000 mg/kg投与群では、対照群と比べて肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

(8) 病理組織学検査 (Table 4)

生存例では、腎臓において尿細管拡張が1000 mg/kg群で3例、集合管拡張が1000 mg/kg群で2例にみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度であった。なお、尿細管拡張は1000 mg/kg群で対照群と比べて用量相関性はないものの有意差が認められ、集合管拡張は有意差はないものの増加傾向にあった。

その他には、胸腺の出血、心臓の小肉芽腫、肝臓の小肉芽腫および小葉中心性の肝細胞空胞変性、腎臓の尿細管好塩基性化、近位尿細管内の好酸性小体、嚢胞、びまん性鉍質沈着および好中球浸潤がみられたが、対照群でも同程度にみられているか、あるいは少数例であることから、偶発的变化と判断した。なお、脾臓、副腎、精巣および脳では対照群および1000 mg/kg群とも異常はみられなかった。

1000 mg/kg群の死亡例では、胸腺の出血、肺の浮腫、胸腺・肺・副腎の自己融解がみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度～軽度であった。なお、剖検で異常の認められた副腎には肥大を示唆する変化はみられなかった。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与6日に3例、投与9日に1例、投与12日に1例と投与17日に1例の計6例が死亡した。死亡例では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられ、自発運動の低下、呼吸緩徐、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、流涎あるいは削瘦が死亡する1～9日前から多くの例で認められた。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられ、また、1例では自発運動の低下、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、削瘦も認められた。

(2) 体重推移 (Fig.3)

交配開始前では、30、100 および 300 mg/kg群の体重は対照群とはほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与4および

8日に体重の有意な低値がみられた。なお、1000 mg/kg群の死亡例では、死亡前に急激な体重減少がみられた。

妊娠期間中では、30, 300 および 1000 mg/kg群の体重は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 21 日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。

哺育期間中では、30 および 100 mg/kg群の体重は対照群と比べて哺育4日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。300 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

(3) 摂餌量 (Fig.4)

交配開始前では、30, 100 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与3, 6 および 13 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中では、30 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。なお、100 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 16 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、一過性の変化であり、投与によるものではないと判断した。

哺育期間中では、各投与群とも対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

(4) 剖検

生存例の剖検において、対照群、30, 100 および 300 mg/kg群では異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、胸腺の萎縮と両側性の副腎の肥大が1例にみられた。

1000 mg/kg群の死亡例の剖検において、胸腺の萎縮が1例、肺の暗赤色化が1例、脾臓の萎縮が6例、両側性の副腎の肥大が6例、腺胃粘膜の暗赤色化が3例、小腸の暗赤色化が2例にみられた。

(5) 器官重量 (Table 5)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対重量の有意な高値がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが、腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対・相対重量の有意な高値がみられた。

(6) 病理組織学検査 (Table 6)

生存例では、腎臓において髓質および乳頭部への好中球浸潤(片側性)が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。脳において、延髄の広範軟化が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。

その他、胸腺の萎縮および出血、脾臓の髓外造血亢進、副腎の束状帯広範壊死、束状帯巢状類洞拡張、束状帯巢状空胞変性および束状帯肥大がみられたが、いずれも少数例であることから、偶発的变化と判断した。

なお、心臓、肝臓および卵巣では対照群および 1000

mg/kg群とも異常はみられなかった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の1例の副腎の肥大と脾臓の萎縮を示唆する変化はみられなかった。

1000 mg/kg投与群の死亡例6例において、肺に浮腫が1例、胸腺に萎縮が1例、脾臓に萎縮が5例と白脾髄の萎縮が1例、副腎に束状帯の過形成が3例と自己融解が1例、腺胃粘膜のびらんが1例と自己融解が1例、小腸粘膜にびらんが1例にみられた。なお、それらの程度は、胸腺の萎縮および白脾髄の萎縮が中等度であったが、その他の所見はいずれもごく軽度～軽度であった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の2例の副腎の肥大、2例の腺胃粘膜の暗赤色化、1例の小腸の暗赤色化を示唆する変化はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 7)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

対照群と 1000 mg/kg投与群の各1組を除いた全例で交尾が確認された。また、1000 mg/kg群の1組で雌が交配期間中に死亡した。交尾日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、交尾率にも、各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。不受胎雌は、30 および 300 mg/kg投与群で各1例みられたが、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。なお、受胎雌の全例が新生児を分娩した。

(2) 妊娠期間、分娩状態、黄体数、着床率および出産率 (Table 8)

妊娠期間は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、いずれの動物とも分娩状態に異常はみられなかった。

黄体数、着床痕数および着床率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

出産率は、対照群、各投与群とも 100%であった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 分娩率、出生率および生存率 (Table 8)

総出産児数および分娩率は、各投与群とも対照群の間に有意差はみられなかった。

哺育0日の新生児数、死産児数、出生率、児の産出率および性比は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の一般状態では、いずれの群とも異常症状は観察されなかった。

哺育4日の新生児数および哺育4日の生存率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の外表面異常の観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。

(2) 新生児の体重 (Table 8)

各投与群の体重は、哺育0日および4日とも雌雄とも対照群との間に有意差はみられなかった。

(3) 新生児の剖検

対照群, 各投与群とも, いずれにも異常はみられなかった。

考察

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。投与量は, 1000 mg/kg を最高用量とし, 以下 300, 100 および 30 mg/kg とした。なお, 対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

雄動物に対して, 1000 mg/kg 群で 1 例が死亡した。死亡例の剖検, 異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において, 死後変化に基づくと考えられる所見の他には, 特筆すべき変化は認められず, 死因は明らかにできなかった。一般状態観察において, 1000 mg/kg 群では投与期間の初期から投与直後に流涎がみられたが, 持続時間は約 30 分間であり, 投与を継続しても持続時間の延長は認められなかった。この流涎は, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの刺激性に基づく変化と考えられる。また, 1000 mg/kg 群では, 摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制がみられた。30 mg/kg 以上の群の尿素窒素の増加, 100 mg/kg 以上の群の腎臓の相対重量の増加, 1000 mg/kg 群の K, Cl, 無機リンの増加, 腎臓の病理組織学検査における尿細管拡張, 集合管拡張などは腎機能の低下を示唆する変化と考えられる。しかし, 尿素窒素, K, Cl, 無機リンの増加は軽度であり, 腎臓の組織学的所見も発生頻度が低く, 程度も軽微であった。1000 mg/kg 群では, 肝臓の相対重量の有意な高値, 血液生化学検査においてトリグリセライドの低値が認められたが, 肝臓の絶対重量には差がみられないこと, 肝臓の病理組織学検査でも異常がみられないことから, 肝臓の相対重量の高値とトリグリセライドの低値は摂餌量の減少に伴う変化と考えられ, 毒性学的に重篤なものではないと判断した。なお, 血液学検査においては, 1000 mg/kg 群でも各検査項目に異常は認められなかった。

雌動物に対して, 1000 mg/kg 群で 6 例が死亡した。死亡例では, 急激な体重減少, 摂餌量の減少がみられ, 剖検において肺の暗赤色化, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎の肥大, 腺胃粘膜および小腸の暗赤色化が認められた。死亡例で異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において肺の浮腫, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎束状帯の過形成, 腺胃粘膜および小腸粘膜のびらんがみられたが, これらの変化は死戦期のストレスに起因するものと考えられる。一般状態観察においては, 雄の場合と同様に 1000 mg/kg 群で流涎がみられた。その他には自発運動の低下, 腹臥, 流涙, 被毛の汚れ, 表皮温下降, 呼吸緩徐が死亡例の多くにみられた。1000 mg/kg 群では, 雄と同様に摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制が交配前投与期間にみられた。器官重量では, 100 mg/kg 以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいは高値傾向, 1000 mg/kg 群で腎臓の相対重量の高値がみられた。また,

1000 mg/kg 群において, 腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤, 脳に延髄の広範軟化巣が認められ, 1 例のみの変化であるが, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの投与により生じた可能性を否定できない。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄で 30 mg/kg/day 未満, 雌で 30 mg/kg/day と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては, 発情回数, 交尾率, 交尾日数, 受胎率および受胎雌数には, 各投与群とも影響はみられなかった。また, 各投与群とも妊娠期間, 分娩状態, 黄体数, 着床痕数, 着床率および出産率にも影響はみられなかった。

新生児に対しては, 各投与群で総出産児数, 分娩率, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 出生率, 児の産出率, 性比には影響はみられなかった。外表観察では, いずれの群とも異常はみられなかった。また, 一般状態, 哺育 4 日の新生児数, 生存率, 体重, 剖検にも影響はみられなかった。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの生殖発生毒性学的な無影響量は, 雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも 1000 mg/kg/day と推察される。

以上のように, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄では 30 mg/kg 投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day 未満, 雌では 100 mg/kg 投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/day と考えられる。また, 生殖発生毒性学的な無影響量は, いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/day と推察される。なお, 筆者らは類似物質であるメタクリル酸(2-ヒドロキシプロピル)エステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を先に実施したが, その一般毒性学的無影響量は雌雄とも 300 mg/kg/day であり⁴⁾, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの方が毒性は強いと考えられる。

文献

- 1) 佐久間昭, “薬効評価-計画と解析 I, II,” 東大出版会, 東京, 1977, 1981.
- 2) C.W. Dunnett, *Biometrics*, **20**, 482(1964).
- 3) W.H. Kruskal, W.A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583(1952).
- 4) 古橋忠和ほか, 化学物質毒性試験報告, **4**, 569(1996).

連絡先

試験責任者：古橋忠和
試験担当者：長瀬孝彦，藤村高志，内藤一嘉，
牧野浩平，渡邊ゆかり，木村均
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒 501-62 岐阜県羽島市福寿町間島6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)
Takahiko Nagase, Takashi Fujimura,
Kazuyoshi Naitou, Kohei Makino,
Yukari Watanabe and Hitoshi Kimura
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory
6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu,
501-62, Japan
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

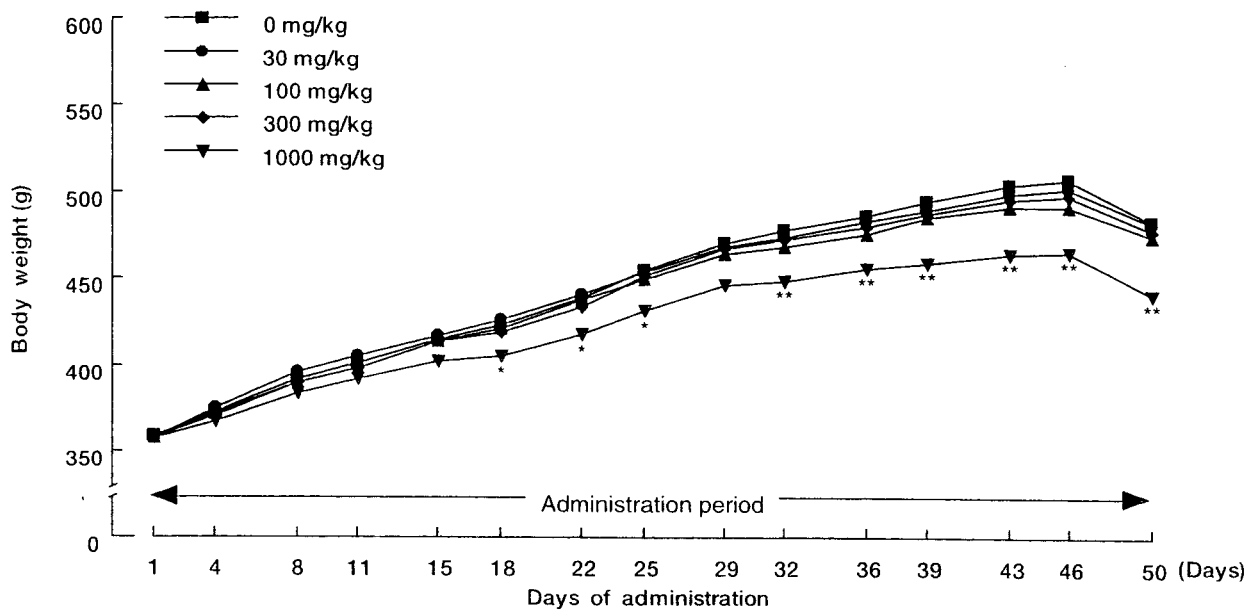


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

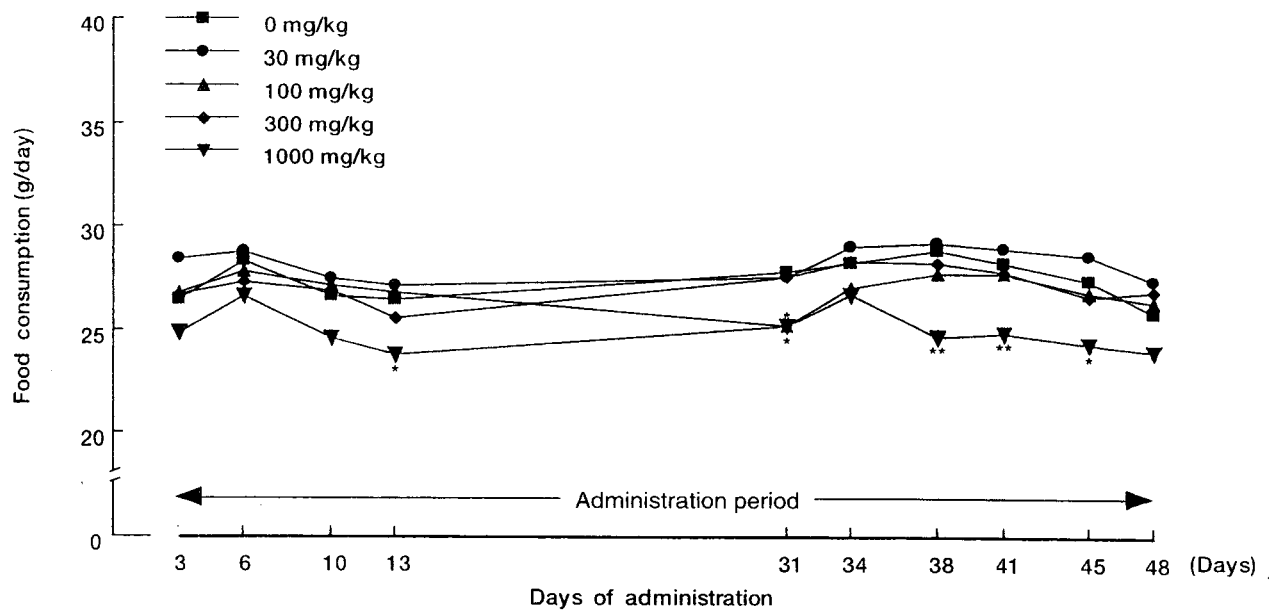


Fig. 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

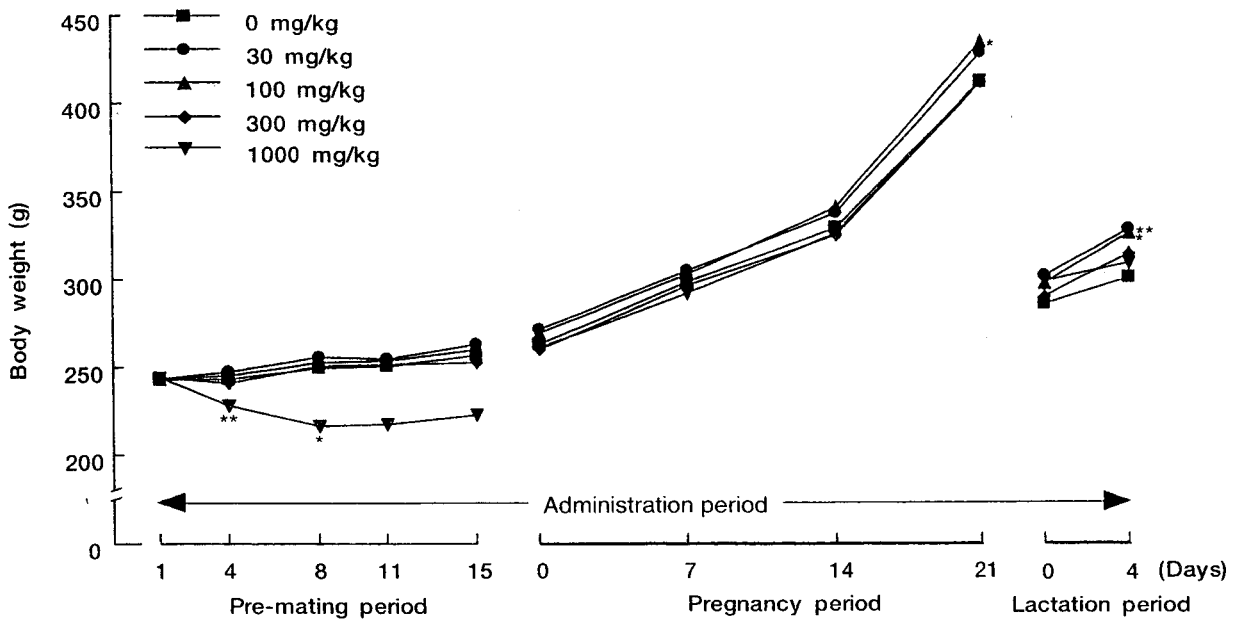


Fig. 3 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

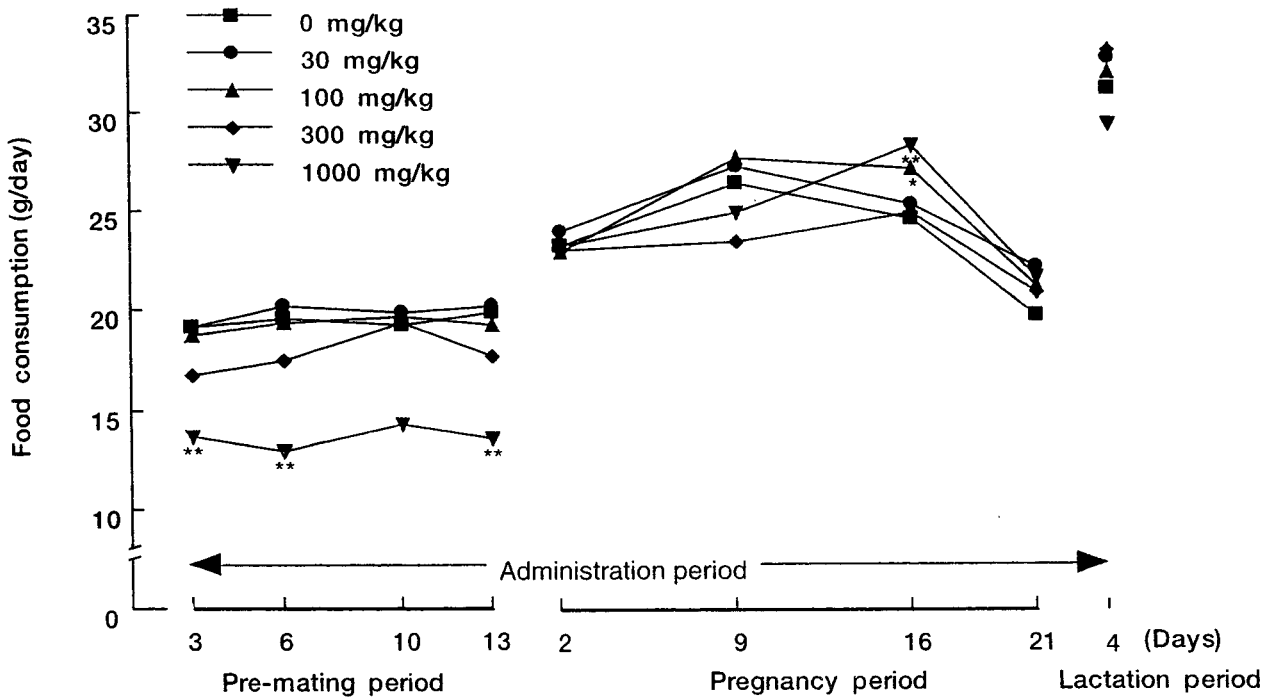


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 1 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose (mg/kg) | 0 | 30 | 100 | 300 | 1000 |
|--|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| Number of males | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 |
| RBC (10 ⁴ /mm ³) | 859.9 ± 32.2 | 874.3 ± 32.3 | 847.8 ± 46.8 | 851.7 ± 30.3 | 845.7 ± 62.4 |
| Hemoglobin (g/dl) | 15.43 ± 0.84 | 15.81 ± 0.68 | 15.63 ± 0.81 | 15.37 ± 0.67 | 15.42 ± 1.10 |
| Hematocrit (%) | 44.54 ± 1.66 | 45.52 ± 1.33 | 44.93 ± 1.44 | 44.64 ± 1.21 | 45.01 ± 2.72 |
| MCV (μm ³) | 51.80 ± 1.23 | 52.09 ± 1.89 | 53.09 ± 2.51 | 52.44 ± 1.35 | 53.28 ± 1.51 |
| MCH (pg) | 17.95 ± 0.63 | 18.08 ± 0.90 | 18.46 ± 1.10 | 18.06 ± 0.72 | 18.25 ± 0.56 |
| MCHC (g/dl) | 34.60 ± 0.90 | 34.73 ± 1.09 | 34.78 ± 1.08 | 34.42 ± 1.05 | 34.25 ± 0.90 |
| Platelet (10 ⁴ /mm ³) | 109.02 ± 12.78 | 115.20 ± 12.08 | 109.88 ± 12.66 | 107.55 ± 9.71 | 109.95 ± 14.15 |
| Reticulocyte (%) | 23.8 ± 5.2 | 24.8 ± 5.2 | 23.3 ± 6.3 | 24.2 ± 6.8 | 22.0 ± 3.5 |
| PT (sec.) | 16.91 ± 1.47 | 16.44 ± 1.24 | 15.96 ± 0.96 | 17.78 ± 2.16 | 16.80 ± 1.80 |
| APTT (sec.) | 31.99 ± 2.70 | 32.98 ± 5.59 | 30.23 ± 2.24 | 32.17 ± 2.31 | 31.03 ± 2.85 |
| Fibrinogen (mg/dl) | 253.8 ± 15.5 | 256.6 ± 20.6 | 254.9 ± 16.1 | 241.7 ± 12.3 | 258.3 ± 29.6 |
| WBC (10 ³ /mm ³) | 54.3 ± 10.0 | 53.1 ± 8.0 | 58.5 ± 14.6 | 53.6 ± 11.8 | 57.3 ± 10.7 |
| Differential leukocyte (%) | | | | | |
| Lymphocyte | 84.0 ± 6.9 | 84.9 ± 7.3 | 86.8 ± 6.9 | 84.3 ± 7.4 | 82.4 ± 11.9 |
| Neutrophil | 15.1 ± 6.7 | 13.8 ± 6.8 | 12.1 ± 6.3 | 14.6 ± 7.3 | 17.0 ± 12.1 |
| Eosinophil | 0.5 ± 0.8 | 0.8 ± 1.0 | 0.8 ± 0.9 | 0.8 ± 1.0 | 0.1 ± 0.3 |
| Basophil | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| Monocyte | 0.4 ± 0.7 | 0.6 ± 0.5 | 0.3 ± 0.6 | 0.3 ± 0.5 | 0.5 ± 0.5 |

Each value shows mean ± S.D.

Table 2 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose (mg/kg) | 0 | 30 | 100 | 300 | 1000 |
|--------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|
| Number of males | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 |
| GOT (IU/l) | 70.94 ± 12.29 | 68.81 ± 10.63 | 70.82 ± 10.88 | 66.21 ± 10.88 | 62.32 ± 12.26 |
| GPT (IU/l) | 21.38 ± 3.24 | 22.33 ± 3.15 | 21.38 ± 4.14 | 21.48 ± 2.20 | 21.06 ± 5.94 |
| ALP (IU/l) | 75.68 ± 11.70 | 79.52 ± 15.80 | 84.17 ± 18.07 | 71.48 ± 14.95 | 75.33 ± 28.16 |
| γ-GTP (IU/l) | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| T-protein (g/dl) | 5.62 ± 0.29 | 5.88 ± 0.27 | 5.74 ± 0.20 | 5.73 ± 0.24 | 5.54 ± 0.36 |
| Albumin (g/dl) | 2.892 ± 0.141 | 2.991 ± 0.164 | 2.912 ± 0.144 | 2.970 ± 0.135 | 2.873 ± 0.169 |
| Protein fraction (%) | | | | | |
| Albumin | 51.49 ± 1.34 | 50.90 ± 1.92 | 50.72 ± 1.46 | 51.81 ± 1.52 | 51.95 ± 2.40 |
| α ₁ -globulin | 22.78 ± 2.13 | 23.61 ± 1.68 | 23.21 ± 1.74 | 22.38 ± 2.50 | 22.44 ± 2.13 |
| α ₂ -globulin | 4.52 ± 0.97 | 4.98 ± 0.71 | 4.83 ± 0.67 | 4.64 ± 0.70 | 4.67 ± 0.96 |
| α ₃ -globulin | 5.60 ± 0.49 | 5.50 ± 0.22 | 5.54 ± 0.51 | 5.33 ± 0.26 | 5.20 ± 0.53 |
| β-globulin | 12.25 ± 1.46 | 11.50 ± 0.77 | 11.77 ± 0.69 | 12.04 ± 0.85 | 12.11 ± 0.97 |
| γ-globulin | 3.37 ± 0.79 | 3.51 ± 0.55 | 3.93 ± 1.03 | 3.81 ± 0.62 | 3.63 ± 0.76 |
| A/G ratio | 1.064 ± 0.057 | 1.039 ± 0.082 | 1.032 ± 0.062 | 1.076 ± 0.066 | 1.085 ± 0.101 |
| T-bilirubin (mg/dl) | 0.072 ± 0.006 | 0.075 ± 0.007 | 0.077 ± 0.011 | 0.076 ± 0.010 | 0.070 ± 0.012 |
| BUN (mg/dl) | 17.36 ± 2.04 | 19.97 ± 2.57* | 19.42 ± 2.11 | 20.82 ± 2.07** | 25.06 ± 4.57** |
| Creatinine (mg/dl) | 0.535 ± 0.025 | 0.546 ± 0.051 | 0.538 ± 0.026 | 0.542 ± 0.056 | 0.544 ± 0.063 |
| Glucose (mg/dl) | 125.26 ± 10.06 | 125.89 ± 8.99 | 124.38 ± 8.77 | 126.18 ± 9.70 | 142.55 ± 43.06 |
| T-cholesterol (mg/dl) | 65.68 ± 13.77 | 61.31 ± 14.52 | 63.34 ± 16.35 | 67.97 ± 9.88 | 56.11 ± 13.66 |
| Triglyceride (mg/dl) | 83.18 ± 47.03 | 99.67 ± 45.12 | 54.01 ± 20.45 | 72.99 ± 29.19 | 47.85 ± 26.99* |
| Na (mEq/l) | 144.41 ± 1.76 | 144.08 ± 1.57 | 144.38 ± 1.72 | 144.03 ± 1.72 | 143.38 ± 1.21 |
| K (mEq/l) | 4.130 ± 0.184 | 4.173 ± 0.231 | 4.293 ± 0.154 | 4.291 ± 0.220 | 4.535 ± 0.418** |
| Cl (mEq/l) | 105.71 ± 1.91 | 105.97 ± 0.99 | 107.15 ± 2.25 | 107.09 ± 0.98 | 107.08 ± 3.36* |
| Ca (mg/dl) | 9.76 ± 0.35 | 9.86 ± 0.30 | 9.68 ± 0.18 | 9.66 ± 0.26 | 9.61 ± 0.39 |
| I-phosphorus (mg/dl) | 6.55 ± 0.70 | 6.55 ± 0.66 | 6.96 ± 0.61 | 6.98 ± 0.74 | 7.95 ± 0.80** |

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 3 Organ weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose(mg/kg) | 0 | 30 | 100 | 300 | 1000 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Number of males | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 |
| Body weight (g) | 484.5 ± 34.2 | 483.2 ± 27.9 | 475.4 ± 26.5 | 478.8 ± 18.5 | 442.5 ± 20.9** |
| Thymus (mg) | 310.63 ± 80.69 | 273.98 ± 72.28 | 277.63 ± 67.98 | 289.81 ± 85.98 | 265.77 ± 64.35 |
| (mg%) | 64.41 ± 17.67 | 56.42 ± 13.56 | 58.31 ± 13.24 | 60.68 ± 18.21 | 60.33 ± 15.66 |
| Liver (g) | 12.099 ± 1.758 | 12.532 ± 1.413 | 12.263 ± 1.484 | 12.647 ± 0.840 | 12.115 ± 0.755 |
| (g%) | 2.489 ± 0.216 | 2.590 ± 0.184 | 2.572 ± 0.196 | 2.640 ± 0.124 | 2.741 ± 0.139** |
| Kidneys (g) | 2.823 ± 0.246 | 2.921 ± 0.247 | 3.017 ± 0.250 | 3.028 ± 0.260 | 3.200 ± 0.466 |
| (g%) | 0.583 ± 0.044 | 0.605 ± 0.055 | 0.635 ± 0.046* | 0.634 ± 0.060* | 0.723 ± 0.110** |
| Testes (g) | 3.283 ± 0.232 | 3.344 ± 0.178 | 3.418 ± 0.286 | 3.158 ± 0.475 | 3.281 ± 0.213 |
| (g%) | 0.682 ± 0.075 | 0.694 ± 0.063 | 0.721 ± 0.070 | 0.662 ± 0.100 | 0.744 ± 0.054 |
| Epididymides (g) | 1.303 ± 0.077 | 1.298 ± 0.143 | 1.295 ± 0.093 | 1.236 ± 0.161 | 1.305 ± 0.093 |
| (g%) | 0.271 ± 0.028 | 0.270 ± 0.042 | 0.271 ± 0.019 | 0.259 ± 0.036 | 0.296 ± 0.030 |

Each value shows mean ± S.D.
Significantly different from control(*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 4 Histopathological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose(mg/kg) | 0 | | | | 30 | | | | 100 | | | | 300 | | | | 1000 | | | | | |
|---|------|---|---|---------|------|---|----|---------|------|---|---|---------|------|---|---|---------|------|---|---|---------|---|-----|
| | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | | |
| HThymus | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [11] | | | | | |
| Hemorrhage | 12 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Heart | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [11] | | | | | |
| Microgranuloma | 11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Liver | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [11] | | | | | |
| Microgranuloma | 10 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | 9 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Degeneration, vacuolar, centrilobular | 11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | 11 | 0 | | | | |
| Kidney | [12] | | | | [12] | | | | [12] | | | | [12] | | | | [11] | | | | | |
| Basophilic tubules | 9 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | | |
| Eosinophilic body, proximal tubule | 10 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 11 | 1 | 1 | 0 | 12 | 0 | | | | |
| Hyaline droplet, proximal tubule | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 11 | 1 | 1 | 0 | 12 | 0 | | | 11 | 0 | | | | |
| Dilatation, renal tubule | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 8 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0** |
| Dilatation, collecting tubule | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 9 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Cyst, unilateral | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Mineralization, diffuse | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Cellular infiltration, neutrophil | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Degeneration, renal tubule, focal, unilateral | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 11 | 1 | 1 | 0 | 11 | 0 | | | | |
| Epididymis | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [11] | | | | | |
| Granuloma, spermatic, left tail | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | 11 | 0 | | | | |

Grade of histopathological finding; ±: Slight, +: Mild, 2+: Moderate, 3+: Marked.

N: No abnormality detected.

A: Abnormality detected.

[]: Number of males examined.

No remarkable changes were recognized in spleen, adrenal, testis and brain of control and 1000 mg/kg groups.

Significantly different from control(**:p<0.01).

Table 5 Organ weight of dams on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose (mg/kg) | 0 | 30 | 100 | 300 | 1000 |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Number of dams | 11 | 11 | 12 | 11 | 5 |
| Body weight (g) | 300.7 ± 40.0 | 328.8 ± 12.7** | 326.1 ± 11.5* | 315.1 ± 17.4 | 309.2 ± 19.1 |
| Thymus (mg) | 163.16 ± 74.90 | 176.37 ± 30.67 | 159.91 ± 54.09 | 160.71 ± 44.26 | 174.02 ± 76.33 |
| (mg%) | 54.11 ± 22.37 | 53.74 ± 9.84 | 48.94 ± 16.16 | 51.51 ± 15.76 | 56.30 ± 24.76 |
| Liver (g) | 12.775 ± 1.020 | 13.159 ± 0.833 | 13.661 ± 1.182 | 13.021 ± 1.717 | 13.050 ± 1.537 |
| (g%) | 4.342 ± 0.849 | 4.005 ± 0.264 | 4.187 ± 0.286 | 4.118 ± 0.349 | 4.216 ± 0.333 |
| Kidneys (g) | 1.785 ± 0.158 | 1.848 ± 0.084 | 1.953 ± 0.151* | 1.947 ± 0.162 | 2.056 ± 0.261** |
| (g%) | 0.605 ± 0.107 | 0.564 ± 0.037 | 0.598 ± 0.038 | 0.618 ± 0.048 | 0.662 ± 0.049* |
| Ovaries (mg) | 98.96 ± 8.50 | 100.55 ± 15.13 | 102.85 ± 11.51 | 95.71 ± 11.23 | 97.44 ± 10.80 |
| (mg%) | 33.83 ± 8.14 | 30.57 ± 4.40 | 31.53 ± 3.28 | 30.35 ± 2.94 | 31.52 ± 2.69 |

Each value shows mean ± S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 6 Histopathological examination of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose (mg/kg) | 0 | | | | 30 | | | | 100 | | | | 300 | | | | 1000 | | | | |
|--|------|---|---|---------|------|---|---|---------|------|---|---|---------|------|---|---|---------|------|---|---|---------|--|
| | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | N | A | ± | + 2+ 3+ | |
| Thymus | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [6] | | | | |
| Atrophy | 11 | 1 | 0 | 1 0 0 0 | | | | | | | | | | | | | 5 | 1 | 0 | 0 1 0 0 | |
| Hemorrhage | 11 | 1 | 1 | 0 0 0 0 | | | | | | | | | | | | | 6 | 0 | | | |
| Spleen | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [6] | | | | |
| Hematopoiesis, extramedullary, increased | 11 | 1 | 0 | 1 0 0 0 | | | | | | | | | | | | | 6 | 0 | | | |
| Kidney | [12] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [0] | | | | [6] | | | | |
| Cellular infiltration, papilla and medulla, neutrophil, unilateral | 12 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 1 | 0 | 1 0 0 0 | |
| Adrenal | [12] | | | | [12] | | | | [12] | | | | [12] | | | | [6] | | | | |
| Necrosis, zona fasciculata, massive | 10 | 2 | 0 | 2 0 0 0 | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 6 | 0 | | | |
| Dilatation, sinusoid, zona fasciculata, focal | 11 | 1 | 1 | 0 0 0 0 | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 6 | 0 | | | |
| Degeneration, vacuolar, zona fasciculata, focal | 11 | 1 | 1 | 0 0 0 0 | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 6 | 0 | | | |
| Hypertrophy, zona fasciculata | 11 | 1 | 1 | 0 0 0 0 | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 6 | 0 | | | |
| Brain | [12] | | | | [12] | | | | [12] | | | | [12] | | | | [6] | | | | |
| Malacia, medulla oblongata, massive | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 12 | 0 | | | 5 | 1 | 0 | 1 0 0 0 | |

Grade of histopathological finding; ±:Slight, +:Mild, 2+:Moderate, 3+:Marked.
N:No abnormality detected.
A:Abnormality detected.
[]:Number of females examined.
No remarkable changes were recognized in heart, liver and ovary of control and 1000 mg/kg groups.

Table 7 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose (mg/kg) | 0 | 30 | 100 | 300 | 1000 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of females | 12 | 12 | 12 | 12 | 7 |
| Number of estrous cases before mating (14 days) | | | | | |
| Mean±S.D. | 3.4 ± 0.5 | 3.3 ± 1.2 | 3.5 ± 0.5 | 3.3 ± 0.6 | 2.9 ± 1.7 |
| Number of pairs | 12 | 12 | 12 | 12 | 7 |
| Number of pairs with successful copulation | 11 | 12 | 12 | 12 | 5 |
| Copulation index (%) ^{a)} | 91.7 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 71.4 |
| Number of conceiving days | | | | | |
| Mean±S.D. | 2.7 ± 1.8 | 3.4 ± 1.6 | 2.8 ± 1.1 | 2.8 ± 1.2 | 2.4 ± 0.9 |
| Number of pregnant females | 11 | 11 | 12 | 11 | 5 |
| Fertility index (%) ^{b)} | 100.0 | 91.7 | 100.0 | 91.7 | 100.0 |
| Number of pregnant females with live pups | 11 | 11 | 12 | 11 | 5 |

a) : (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) : (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 8 Observation of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

| Dose (mg/kg) | 0 | 30 | 100 | 300 | 1000 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Number of dams | 11 | 11 | 12 | 11 | 5 |
| Length of gestation (days) | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 22.64 ± 0.50 | 22.27 ± 0.47 | 22.50 ± 0.52 | 22.18 ± 0.40 | 22.40 ± 0.55 |
| Number of corpora lutea | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 17.6 ± 1.4 | 18.3 ± 2.0 | 18.8 ± 2.1 | 17.1 ± 2.2 | 16.8 ± 2.8 |
| Number of implantation scars | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 16.5 ± 1.4 | 16.5 ± 0.9 | 17.2 ± 2.1 | 15.9 ± 1.8 | 15.8 ± 2.7 |
| Implantation index ^{a)} | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | 93.5 ± 6.4 | 91.1 ± 7.6 | 91.9 ± 9.2 | 93.5 ± 7.2 | 93.8 ± 4.0 |
| Gestation index (%) ^{b)} | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Number of live pups born | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 14.5 ± 1.0 | 15.1 ± 1.0 | 15.8 ± 1.8 | 15.1 ± 2.3 | 14.0 ± 2.9 |
| Sex ratio at birth ^{c)} | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 1.42 ± 1.45 | 1.31 ± 0.71 | 1.47 ± 1.37 | 0.83 ± 0.21 | 1.44 ± 0.63 |
| Birth index ^{d)} | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | 88.5 ± 6.1 | 91.3 ± 6.7 | 91.9 ± 5.0 | 94.5 ± 6.6 | 88.0 ± 6.0 |
| Number of dead pups on day 0 of lactation | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 0.8 ± 1.0 | 0.3 ± 0.5 | 0.8 ± 1.0 | 0.1 ± 0.3 | 0.4 ± 0.5 |
| Number of pups born | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 15.4 ± 1.2 | 15.4 ± 1.1 | 16.5 ± 2.3 | 15.2 ± 2.4 | 14.4 ± 3.2 |
| Delivery index ^{e)} | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | 93.5 ± 4.8 | 92.8 ± 6.5 | 95.9 ± 5.4 | 95.1 ± 6.8 | 90.4 ± 8.0 |
| Live birth index ^{f)} | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | 94.9 ± 5.9 | 98.3 ± 3.0 | 95.9 ± 4.9 | 99.5 ± 1.8 | 97.6 ± 3.3 |
| Number of live pups on day 4 of lactation | | | | | |
| Mean±S.D. per dam | 14.3 ± 0.9 | 14.8 ± 1.1 | 15.3 ± 2.0 | 14.8 ± 2.3 | 14.0 ± 2.9 |
| Viability index ^{g)} | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | 98.2 ± 3.1 | 98.3 ± 4.0 | 97.3 ± 4.5 | 98.2 ± 4.4 | 100.0 ± 0.0 |
| Number of external anomalies | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| Body weight of pups (g) | | | | | |
| Mean%±S.D. per dam | | | | | |
| Male Day 0 | 6.43 ± 0.50 | 6.39 ± 0.37 | 6.55 ± 0.56 | 6.37 ± 0.51 | 6.82 ± 0.74 |
| 4 | 10.19 ± 0.80 | 10.02 ± 0.77 | 10.23 ± 1.15 | 10.13 ± 1.10 | 10.44 ± 1.62 |
| Female Day 0 | 6.11 ± 0.45 | 6.07 ± 0.44 | 6.02 ± 0.48 | 6.04 ± 0.49 | 6.34 ± 0.67 |
| 4 | 9.66 ± 0.62 | 9.73 ± 0.88 | 9.48 ± 0.93 | 9.75 ± 1.04 | 9.90 ± 1.56 |

a) : (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

b) : (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

c) : Number of male pups/number of female pups.

d) : (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

e) : (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

f) : (Number of live pups born/number of pups born)×100.

g) : (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.